

Aus dem  
Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

# Charakterisierung der großen GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) im intrazellulären Proteintransport



## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Florian Hoff**  
aus Mönchengladbach

Marburg, 2015

Vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
angenommen am: 04.12.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Jacob

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Maier



## Zusammenfassung

Der intrazelluläre Proteintransport in polaren Epithelzellen basiert zunächst auf der Seite der zu transportierenden Moleküle aus einem komplexen Code von Sortiersignalen, Proteinmodifikationen und einer Assoziation mit spezifischen Lipidkompositionen. Dem gegenüber steht auf der anderen Seite eine hochspezialisierte zelluläre Transportmaschinerie, bestehend aus einem breiten Spektrum verschiedener Protein- und Zytoskelettkomponenten, die diesen Code zu entschlüsseln vermag und das Transportgut zur jeweiligen Destination befördert. Auf der Suche nach bislang unbekannten Faktoren im Proteintransport wurde bei einer Analyse von Vesikeln des biosynthetischen *lipid raft*-unabhängigen Transportwegs in polaren Epithelzellen die große GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) entdeckt. Mx1 gilt allgemein als streng Interferon-induziertes Protein, das im Zuge viraler Infektionen synthetisiert wird und eine antivirale Immunantwort vermittelt. Der genaue Mechanismus hinter dieser antiviralen Aktivität ist bislang weitgehend unverstanden. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Mx1 in der Lage ist Viruskomponenten innerhalb der Zelle fehlzuleiten, sodass sie nicht mehr für eine virale Replikation zur Verfügung stehen. Eine mögliche Funktion von Mx1 im intrazellulären Transportsystem ist daher vorstellbar und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Mx1 wird in polaren Epithelzellen der caninen Niere (MDCK-Zellen) konstitutiv, ohne Interferoninduktion, exprimiert. In dieser Zelllinie zeigte diese große GTPase eine Assoziation mit *post*-Golgi vesikulären Membranen, die positiv für den Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> waren und *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Domäne transportiert wurden. Eine Reduktion der Mx1-Synthese mittels RNA-Interferenz bewies, dass die große GTPase nicht nur mit diesen Vesikeln assoziiert war, sondern auch eine Rolle in ihrem Transport ausübte. Die Mx1-Depletion führte zu signifikant weniger p75<sup>NTR</sup> an der apikalen Plasmamembran. Darüber hinaus wurde die Sekretion der zwei löslichen Peptide Galectin-3 und gp80 ebenso signifikant reduziert. Der Mx1-*knockdown* resultierte nicht in einer veränderten Beförderung dieser drei Proteine an die basolaterale Membran, sondern zu einer verminderten Effizienz des apikalen Transports. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien und des *Proximity Ligation Assays* (PLA) konnten Mx1-positive Membranen dem endosomalen System zugeordnet werden. Dort lag die große GTPase zusammen mit Galectin-3 vor, ein Lektin, welches für die korrekte Sortierung *lipid raft*-unabhängiger Proteine essentiell ist. Des Weiteren interagierte Mx1 direkt mit dem Tubulin- und Aktinzytoskelett und zeigte im PLA eine unmittelbare Nähe zu Tubulin-abhängigen Motorproteinen. Welche genaue Aufgabe Mx1 im intrazellulären Transport ausübt, ist noch nicht verstanden. Durch die Zugehörigkeit zur Dynamin-Superfamilie und Strukturähnlichkeiten zu den klassischen Dynaminen, ist eine Funktion in der Fission von Transportvesikeln im *post*-Golgi endosomalen Netzwerk möglich. Eine Expressionsstudie zeigte, dass Mx1 nicht nur in MDCK-Zellen konstitutiv hergestellt wurde, sondern auch in weiteren Zelllinien ohne Interferonbehandlung detektiert werden konnte. Nun wurde erstmals mit dieser Arbeit eine Funktion von Mx1 im biosynthetischen Proteintransport aufgezeigt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Mx1 nicht nur als antiviraler Faktor fungiert, sondern generell in intrazellulären Transportmechanismen involviert ist.



## Summary

The intracellular protein transport in polarized epithelial cells is based, in view of the transported cargo molecules, on a complex code of sorting signals, protein modifications and an association with specific lipid compositions. On the other side exists a highly specialized cellular transport machinery, consisting of a diverse set of various proteins and cytoskeletal components, which is able to decrypt this code and transports the cargo molecules to their particular destination. In search of yet unknown factors in protein transport, the large GTPase Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) was discovered on vesicles of the biosynthetic lipid raft independent pathway in polarized epithelial cells. Mx1 is generally known as an interferon induced protein, which is synthesized after viral infections and which provides an antiviral immune response. The precise mechanism behind this antiviral activity is so far unknown. Different publications reveal that Mx1 is able to mislocalize viral components within the cell, which makes them unavailable for viral replication. Thus a possible function of Mx1 in the intracellular transport system is conceivable and the research focus of this dissertation.

Mx1 is constitutively expressed in polarized canine kidney epithelial cells (MDCK cells) without interferon induction. In this cell line, the large GTPase was associated with *post*-Golgi vesicular membranes, which were positive for the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> and lipid raft independently transported towards the apical domain. The reduction of Mx1 synthesis via RNA interference demonstrated that Mx1 was not simply associated with these vesicles, but it also performed a role in their transport. Mx1 depletion led to significantly less p75<sup>NTR</sup> at the apical plasma membrane. Furthermore the secretion of the two soluble peptides galectin-3 and gp80 was also significantly reduced. The Mx1 knockdown did not result in an altered appearance of these three proteins at the basolateral membrane, but rather in a decreased efficiency of apical transport. With the help of immunofluorescence and the Proximity Ligation Assay (PLA), Mx1 was localized to membranes of endosomal origin. There, the large GTPase colocalized with galectin-3, a lectin which is essential for the correct sorting of lipid raft independent proteins. In addition Mx1 interacted directly with the tubulin- and actin cytoskeleton and the PLA showed a close proximity to tubulin dependent motor proteins. The precise function of Mx1 in intracellular transport is not yet understood. Because of its affiliation to the dynamin superfamily and structural homologies to classical dynamins, a function in fission of transport vesicles at the *post*-Golgi endosomal system is possible. The analysis of Mx1 expression revealed that it is not only constitutively synthesized in MDCK cells, but also present in other cell lines without interferon induction.

This work demonstrates for the first time a role of Mx1 in biosynthetic protein transport. The presented observations indicate that Mx1 is not only an antiviral factor, but rather generally involved in intracellular transport mechanisms.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	II
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI

### 1. Einleitung

1.1 Polare Epithelzellen .....	1
1.2 Polarer Proteintransport .....	3
1.2.1 Basolaterale Sortiersignale .....	3
1.2.2 Apikale Sortiersignale .....	3
1.2.3 Transportwege in polaren Epithelzellen .....	4
1.2.4 <i>Lipid rafts</i> .....	6
1.2.5 Galectine .....	7
1.3 Zytoskelett und Motorproteine .....	8
1.4 Die Entdeckung von Mx1 im apikalen Proteintransport .....	10
1.5 Die Dynamin-Superfamilie .....	11
1.5.1 Klassische Dynamine .....	12
1.5.2 Mx-Proteine .....	14
1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	18

### 2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur .....	19
2.1.1 Kultivierung von MDCK-Zellen .....	19
2.1.2 Passagieren .....	19
2.1.3 Einfrieren und Auftauen .....	20
2.1.4 Transfektion .....	20
2.1.5 DNA-Transfektion von MDCK-Zellen mittels Lipofektion .....	20
2.1.6 DNA-Transfektion von COS-7-Zellen mittels DEAE-Dextran .....	21
2.1.7 siRNA-Transfektion von MDCK-Zellen .....	21
2.2 Biochemie .....	24
2.2.1 Herstellen von Zelllysaten .....	24
2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry .....	24
2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	25
2.2.4 Westernblot .....	26
2.2.5 (Co-)Immunpräzipitation .....	27
2.2.6 Oberflächen-IP .....	28
2.2.7 Oberflächen-Biotinylierung .....	30
2.2.8 Sekretionsstudie .....	31
2.3 Mikroskopie .....	32
2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	32

2.3.2 <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> -Mikroskopie.....	32
2.3.3 <i>Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return</i> .....	33
2.3.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	34
2.3.5 Lebendzellmikroskopie .....	35
2.3.6 <i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i> .....	35
2.3.7 Immunfluoreszenz.....	37
2.3.8 <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	38
2.3.9 SNAP-tag.....	40
2.3.10 Internalisierung von rekombinantem Galectin-3.....	40
2.3.11 Immunfluoreszenz von histologischen Präparaten.....	41
2.4 Auswertung und Statistik .....	41
2.4.1 Quantifizierung biochemischer Experimente .....	41
2.4.2 Quantifizierung mikroskopischer Experimente.....	41
2.4.3 Statistik .....	41
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Validierung der Mx1-Antikörperspezifität.....	48
3.2 Kolokalisierung mit exozytotischen p75-GFP-positiven Transportvesikeln .....	53
3.3 Assoziation mit dynamischen intrazellulären Membranen.....	56
3.4 Immunfluoreszenz mit endosomalen Markerproteinen .....	58
3.5 <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	60
3.6 Assoziation mit Galectin-3 .....	63
3.7 Interaktion mit Komponenten des Zytoskeletts.....	65
3.8 Assoziation mit Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen .....	69
3.9 Assoziation mit Dynamin-2.....	71
3.10 Mx1- <i>knockdown</i> und Sekretionsstudie .....	73
3.11 Transportstudie von p75-GFP nach Mx1- <i>knockdown</i> .....	75
3.12 Expression von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarität .....	79
3.13 Immunhistochemie von Mx1 in humanen Nierenpräparaten .....	81
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Evaluation und Bedeutung der endogenen Proteinmarkierung .....	84
4.2 Mx1 kolokalisiert mit exozytotischen <i>lipid raft</i> -unabhängig transportierten Vesikeln .....	85
4.3 Mx1 übt eine Funktion im Transport apikaler Proteine aus .....	87
4.4 Mx1 interagiert mit dynamischen intrazellulären Membranen .....	87
4.4.1 Evaluation der FRAP-Analyse.....	88
4.5 Mx1 ist im endosomalen Netzwerk lokalisiert .....	89
4.6 Etablierung des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	91
4.7 Mx1 ist mit Galectin-3 assoziiert.....	92
4.8 Mx1 interagiert mit dem Aktin- und Tubulinzytoskelett.....	94
4.9 Mx1 ist mit Kif5 und Dynein assoziiert .....	95

4.10 Mx1 kolokalisiert mit Dynamin-2 .....	97
4.11 Wirkt Mx1 als Fissionskomponente im intrazellulären Transport? .....	98
4.12 Mx1 wird polaritätsabhängig exprimiert und ist nicht ausschließlich durch Interferon reguliert .	100
4.13 Mx1 ist in distalen Tubuli und im Sammelrohr der humanen Niere lokalisiert.....	102
4.14 Zusammenfassung und Ausblick .....	103
4.15 Zusammenfassendes Modell.....	104

## **5. Anhang**

5.1 Weitere Ergebnisse .....	105
5.2 Literaturverzeichnis .....	108
5.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	121
5.4 Lebenslauf .....	123
5.5 Publikationen & Poster .....	124
5.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	124
5.7 Ehrenwörtliche Erklärung .....	125

**Abkürzungsverzeichnis**

ADL	<i>Arabidopsis thaliana dynamin-like</i>
ARE	<i>apical recycling endosome</i> / apikales Recyclingendosom
Arp2/3	<i>Actin-Related Proteins 2/3</i>
ASE	<i>apical sorting endosome</i> / apikales Sortierendosom
ATP	Adenosintriphosphat
BSE	<i>basolateral sorting endosome</i> / basolaterales Sortierendosom
BSE	<i>Bundle-Signaling Element</i>
CCP	<i>clathrin coated pit</i>
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>
COPI	<i>coat protein complex I</i>
CRE	<i>common recycling endosome</i> / gemeinsames Recyclingendosom
Dlp	<i>Dynamin-like protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergenz-resistente Membranen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
<i>g</i>	relative Zentrifugalbeschleunigung
GBP	<i>Guanylate-binding protein</i>
GED	GTPase-Effektordomäne
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPI-AP	Glycosylphosphatidylinositol-Anker-Proteine
GSDIM	<i>Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return</i>
GT	Galaktosyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Protonen-Kalium-ATPase
HA	Influenza Hemagglutinin
HBV	Hepatitis B Virus
HeLa	Henrietta Lacks
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
ISG	Interferon-stimulierte Gene
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

LDL-R	<i>Low Density Lipoprotein-Receptor</i>
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
M6P	Mannose-6-Phosphat
MD	Mitteldomäne
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute
MTOC	<i>Microtubule Organizing Center</i>
Mx1	<i>Myxovirus Resistance Protein 1</i>
MxA	humanes Mx1
Myo	Myosin
NA	Influenza Neuraminidase
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
N-WASP	<i>neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>
OPA1	<i>optic atrophy 1</i>
p75 <sup>NTR</sup>	Neurotrophinrezeptor p75 <sup>NTR</sup>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Proteaseinhibitoren
pIgR	polymerischer Immunglobulin-A-Rezeptor
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PRD	GTPase-Effektordomäne
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid / Ribonukleinsäure</i>
RT	Raumtemperatur
SH3	<i>Src Homology 3</i>
SI	Saccharase-Isomaltase
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> -Mikroskopie
Vps1	<i>Vacuolar protein sorting 1</i>
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein
YFP	<i>yellow fluorescent protein / gelb fluoreszierendes Protein</i>

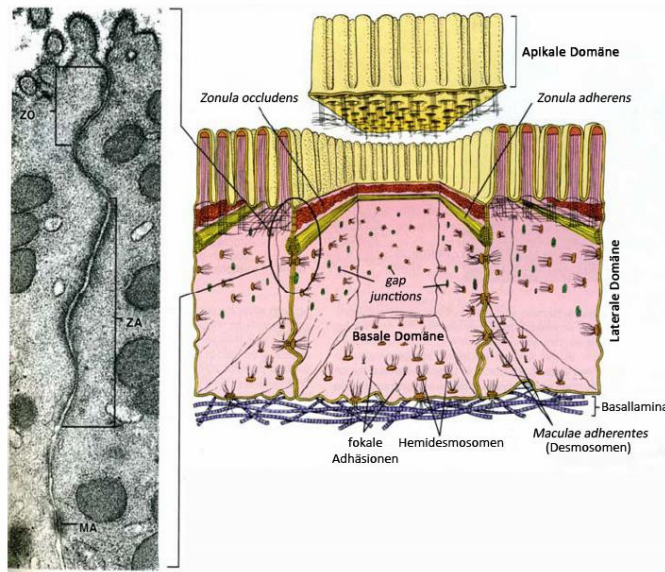
## 1. Einleitung

Hochentwickelte vielzellige tierische Lebewesen (Eumetazoa = Gewebetiere) besitzen vier Grundgewebearten, die in Zusammenkunft den Körper und die darin enthaltenen verschiedenen spezialisierten Organe eines Organismus ausbilden. In einem Gewebe werden differenzierte Zellen mit ihrer extrazellulären Matrix zusammengefasst, die eine gleiche oder ähnliche Funktion aufweisen und so im Organismus eine gemeinsame Aufgabe erfüllen. Die tierischen Gewebetypen setzen sich aus Nerven-, Muskel-, Binde- bzw. Stützgewebe und schließlich dem Epithelgewebe zusammen, wobei intrazelluläre Transportvorgänge des Letzteren im Fokus dieser Arbeit stehen. Das Epithel bildet die Grenzschicht eines Organismus zu seiner Umwelt, indem es die komplette äußere Oberfläche bedeckt, aber auch sämtliche innere Hohlräume der Organe auskleidet. Bedeckende bzw. auskleidende Epithelien (z.B. die Haut) bieten vor allem durch ihre engen Zell-Zell-Kontakte eine Schutzfunktion und verhindern als Diffusionsbarriere das unkontrollierte Eindringen von Stoffen aller Art in den Körper. Ferner dienen sie zum gezielten Austausch mit dem umgebenden Milieu, so z.B. im Darm bei der Resorption von Nährstoffen oder in der Lunge zum Gasaustausch. Gesonderte Drüsenepithelzellen sind auf eine sekretorische Funktion spezialisiert und produzieren z. B. Speichel in der Mundschleimhaut oder Verdauungsenzyme in der Magenschleimhaut.

Damit das Epithel diese vielfältigen Aufgaben erfüllen kann, werden besondere Anforderungen an die Zellen dieses Gewebes gestellt. So müssen Epithelzellen auf der einen Seite die Resorption oder Sekretion von Stoffen aus bzw. in die Umwelt bewerkstelligen und auf der anderen Seite den Kontakt zur extrazellulären Matrix und zum Kreislaufsystem des Organismus herstellen. Dies hat zur Entwicklung einer sogenannten polaren Zellmorphologie geführt mit distinkten, hochspezialisierten und voneinander separierten Membrandomänen (Ross und Pawlina, 2010).

### 1.1 Polare Epithelzellen

Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung ihrer Polarität und die Entwicklung einer Epithelschicht müssen die Zellen in engem Kontakt zueinander und zur, an die extrazelluläre Matrix angrenzenden, Basallamina stehen (siehe Abbildung 1.1). Zell-Zell- bzw. Zell-Basallamina-Verbindungen werden durch Desmosomen, die *Zonula adherens*, Hemidesmosomen oder fokale Adhäsionen hergestellt. Die Proteinkomponenten dieser Strukturen interagieren mit den Ankerproteinen benachbarter Zellen bzw. der Basallamina, wodurch eine enge Verknüpfung gewährleistet wird. Auf der zytosolischen Seite besteht dabei eine Verbindung zu Elementen des Zytoskeletts, was die mechanische Stabilität auf die gesamte Zelle überträgt. *Gap junctions* zählen ebenfalls zu den Zell-Zell-Verbindungen, doch haben sie keine strukturgebende Aufgabe sondern dienen dem interzellulären Austausch bzw. der Informationsübermittlung durch Ionen oder kleinere Moleküle. Eine besondere Aufgabe besitzt die *Zonula occludens*, auch als *tight junctions* bezeichnet: Sie verschließt die Zellzwischenräume des Epithels und ermöglicht somit das Entstehen der oben genannten Diffusionsbarriere zur Außenwelt.



**Abbildung 1.1: Aufbau einer polaren Epithelzelle**

Linke Seite: Elektronenmikroskopische Aufnahme der apikalen Region zweier benachbarter Epithelzellen. Rechte Seite: Illustration von polaren Epithelzellen mit ihren verschiedenen Zell-Zell- bzw. Zell-Basallamina-Verbindungen. Zur besseren Veranschaulichung wurde die apikale Domäne mit Mikrovilli einer Epithelzelle angehoben. ZO: *Zonula occludens*, ZA: *Zonula adherens*, MA: *Macula adherens* (modifiziert nach Ross und Pawlina, 2010).

In Epithelzellen existieren drei Membrandomänen, die als apikale, laterale und basale Membran bezeichnet werden (siehe Abbildung 1.1). Die apikale Membran unterscheidet sich in ihrer Funktion und in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung von den beiden anderen Membrandomänen. Die basale und laterale Membran werden auf Grund ihrer Ähnlichkeit und gemeinsamen Abgrenzung zur apikalen Membran daher häufig als basolaterale Membran zusammengefasst. Die *Zonula occludens* trennt die beiden funktionellen Membranbereiche voneinander und verhindert die Diffusion von Molekülen zwischen ihnen, wodurch die Zellpolarität erhalten bleibt (Ross und Pawlina, 2010).

Die apikale Domäne des Epithels liegt dem Lumen eines Organs zugewandt. Wie in Abbildung 1.1 zu sehen formt sie Membranausstülpungen, die als Mikrovilli bezeichnet werden und der Oberflächenvergrößerung dienen. Dies erlaubt z. B. eine vermehrte und effizientere Resorption von Nährstoffen im Dünndarm, wo die Mikrovilli einen dichten Bürstensaum ausbilden. Über die basolaterale Membran werden die aufgenommenen Produkte an den Organismus weitergeleitet und die Epithelzellen mit wichtigen Wachstums- und Stoffwechselfaktoren versorgt. Die apikale Membran ist reich an Sphingolipiden und Cholesterin, sie verstärken die extensiv geformte Membran in ihrer Stabilität (van Meer und Simons, 1988). Die basolaterale Membran zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Phosphatidylcholin aus. Neben ihrem verschiedenen Lipidgehalt differenzieren sich die Membrandomänen auch in ihren assoziierten bzw. integrierten Proteinkomponenten. So kommen bestimmte Proteine ausschließlich an der apikalen Membran vor, wo sie eine bestimmte Funktionen ausüben. Beispielhaft sind hier die Verdauungsenzyme Saccharase-Isomaltase (SI) oder Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) zu nennen, die sich im apikalen Bürstensaum von intestinalen Epithelzellen befinden (Hauri *et al.*, 1985). In der basolateralen Membran befinden sich verschiedene Transporter, u. a. die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die die zelluläre Homöostase erhalten und den Stoffaustausch mit dem Kreislaufsystem ermöglichen (Wright *et al.*, 1981).

Damit diese polare Distribution von Lipiden und Proteinen zur jeweiligen Membrandomäne möglich ist, hat sich in Epithelzellen ein komplexes Transportsystem entwickelt. Störungen dieses Systems und die Fehllokalisierung von Proteinen wurden mit verschiedenen Krankheitsbildern wie der kongenitalen



Saccharase-Isomaltase-Defizienz, der familiären Hypercholesterinämie oder dem Bartter Syndrom assoziiert (Koivisto *et al.*, 2001, Naesens *et al.*, 2004, Keiser *et al.*, 2006).

## 1.2 Polarer Proteintransport

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen des biosynthetischen Proteintransports, sodass diese im Folgenden näher vorgestellt werden. Apikal oder basolateral orientierte Proteine werden im sekretorischen Transportweg durch verschiedene Komponenten auf Grund von Struktureigenschaften bzw. Proteinmodifikationen oder internen topogenen Signalen erkannt und zur jeweils richtigen Membran sortiert (zur Übersicht siehe Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005, Mellman and Nelson, 2008).

### 1.2.1 Basolaterale Sortiersignale

Oftmals typisch für Proteine, die zur basolateralen Domäne transportiert werden, sind zytoplasmatische topogene Aminosäuresequenzen. Diese Sortiersignale enthalten verbreitet Tyrosin- oder (Di)Leucin-Motive, wie z. B. die Aminosäureabfolgen NPXY oder Yxx $\varphi$  (x steht für jede beliebige Aminosäure,  $\varphi$  für einen hydrophoben Rest; Matter *et al.*, 1992, Hunziker und Fumey, 1994, Matter *et al.*, 1994). Proteine, die solche topogenen Signale tragen werden von Adapterproteinen (AP-1B, AP-3, AP-4) erkannt und in bestimmte Vesikelpopulationen sortiert. Im Fall von AP-1B und AP-3 entstehen so Clathrin-umhüllte Transportvesikel, die zur basolateralen Membran befördert werden. Proteine, die auf diese Weise sortiert werden, sind z. B. der *Low Density Lipoprotein Receptor* (LDLR), das Vesikuläre Stomatitis Virus-Glykoprotein (VSV-G) oder die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Folsch, 2008). Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass eine Hierarchie bei den diversen Sortiersignalen existiert. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass exozytische Proteine *per se* an die basolaterale Membran geleitet werden (Simons und Wandinger-Ness, 1990). Doch dann wurde gezeigt, dass die Deletion einer zytoplasmatischen Sequenz des polymerischen Immunglobulin-A-Rezeptors (pIgR) zu dessen direkter apikaler Beförderung führte (Mostov *et al.*, 1986). Normalerweise wird dieser Rezeptor zunächst an der basolateralen Membran exponiert und gelangt erst durch nachfolgende Transzytose an die apikale Domäne. Ferner konnte man beobachten, dass die Verknüpfung eines basolateralen Sortiersignals an die gewöhnlich apikalen Proteine Influenza Hemagglutinin (HA) oder Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> zu ihrer basolateralen Erscheinung führten (Brewer und Roth, 1991, Le Bivic *et al.*, 1991). Dies beweist, dass basolaterale topogene Sequenzen dominant gegenüber einer apikalen Sortierung sind. Des Weiteren müssen noch andere Sortiersignale vorhanden sein, da u. a. der Transferrin-Rezeptor (TfR) unabhängig von einer Tyrosin- oder Leucin-Sequenz zur basolateralen Membran gelangt (Odorizzi und Trowbridge, 1997).

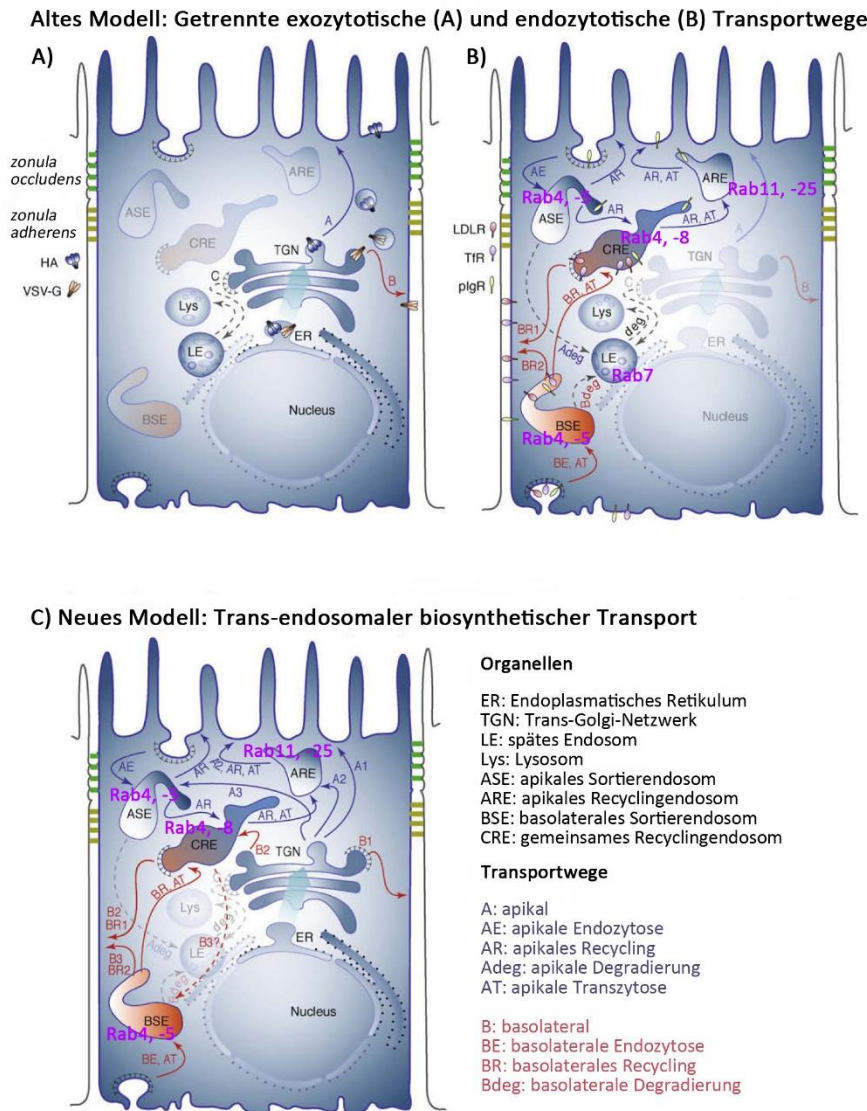
### 1.2.2 Apikale Sortiersignale

Apikale Sortiersignale treten im Vergleich zu ihren basolateralen Pendanten in einer größeren Diversität auf. Hier stehen zytoplasmatische Sequenzen weniger im Vordergrund, sondern verschiedene Proteinmodifikationen wurden als entscheidend für die Beförderung zur luminalen Membran identifiziert. Ein prominentes Beispiel für eine solche Modifikation ist eine Glycosylphosphatidylinositol

(GPI)-Verankerung (Lisanti *et al.*, 1989). GPI-Anker-Proteine (GPI-APs) komplexieren in bestimmten Membrandomänen mit weiteren Proteinen, was zur Ausbildung von apikalen Transportvesikeln führt (Paladino *et al.*, 2007). Als weitere Modifikation spielt die Glykosylierung eines Proteins eine wichtige Rolle in seiner Sortierung. Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Glykosylierungsarten: N-Glykane werden an Aminogruppen (N-) der Aminosäure Asparagin von Proteinen angefügt, dies geschieht bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER). O-Glykane werden an Hydroxylgruppen unter Ausbildung einer Etherbindung (O-) mit den Aminosäuren Serin oder Threonin der Proteine verknüpft, wobei dies erst durch Enzyme im Golgi-Apparat geschieht. Es konnte gezeigt werden, dass das Hinzufügen von N-Glykanen an Somatotropin, das in polaren Epithelzellen von beiden Membrandomänen sekretiert wird, eine ausschließlich apikale Sekretion induziert (Scheiffele *et al.*, 1995). Dementsprechend führte das Entfernen der N-Glykosylierung von gp80, das in Epithelzellen der Hundeniere (MDCK) fast exklusiv apikal sekretiert wird, zum Verlust des polaren Transports (Parczyk und Koch-Brandt, 1991). Die O-Glykosylierung ist verantwortlich für die korrekte Lokalisierung des Neurotrophinrezeptors p75<sup>NTR</sup> oder der SI an der apikalen Domäne (Yeaman *et al.*, 1997, Spodsberg *et al.*, 2001). Neben den posttranslationalen Proteinmodifikationen enthalten manche Proteine auch in ihrer Aminosäuresequenz, ähnlich wie bei der basolateralen Sortierung, ein Signal für ihre apikale Beförderung. Dieses Signal liegt z.B. bei HA oder der Influenza Neuraminidase (NA) im Transmembranbereich der Proteine (Kundu *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 1998). Daneben werden, wie im Fall von Megalin, ebenso zytoplasmatische Motive als essentiell erachtet (Marzolo *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Transportwege in polaren Epithelzellen

Im Interesse vieler im Proteintransport forschender Arbeitsgruppen stehen die intrazellulären Knotenpunkte, in denen die Separation von Proteinen mit unterschiedlichen Zielen stattfindet. Sekretorische Proteine gelangen zunächst kotranslational ins ER und gelangen von dort in den Golgi Apparat. Nach Durchlaufen der verschiedenen Zisternen erreichen sie das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Dieses Kompartiment galt lange Zeit als Hauptstation für die Unterteilung in distinkte Transportrouten, da hier u. a. die Separation von apikalem HA und basolateralem VSV-G erfolgt (siehe Abbildung 1.2 A; Rodriguez-Boulán und Musch, 2005). Man ging davon aus, dass hier verschiedene Vesikelpopulationen entstehen, die direkt zur jeweiligen Membrandomäne gelangen. Des Weiteren nahm man an, dass der biosynthetische Transport getrennt von endozytotischen Prozessen und dem Proteinrecycling ablaufen (siehe Abbildung 1.2 B). Für diese Ereignisse sind endosomale Kompartimente von entscheidender Bedeutung. Sie erhalten das endozytierte Material und führen es entweder der lysosomalen Degradierung zu oder transportieren es, z.B. wie den TfR, nach ihrer Internalisierung zurück an die Plasmamembran. Ein schon seit langem bekannter Weg um auch vom TGN das endosomale Netzwerk zu erreichen ist die Interaktion mit dem Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor. Dieser Rezeptor erkennt im TGN Proteine mit einem M6P-Rest, z. B. lysosomale Hydrolasen, woraufhin sie in Clathrin-umhüllten Vesikeln ins späte endosomale/lysosomale Netzwerk transportiert werden (Glickman *et al.*, 1989).



**Abbildung 1.2: Transportwege in polaren Epithelzellen**

Zunächst ging man davon aus, dass der exozytotische Transport (A) getrennt vom endozytotischen Transport und Recyclingwegen (B) stattfindet. Das TGN galt lange Zeit als Hauptsortierstation für den sekretorischen Transport zu den verschiedenen Membrandomänen. Endosomale Kompartimente zeichnen sich durch die Anwesenheit verschiedener Rab-Proteine (lila) aus und lassen sich dadurch voneinander unterscheiden. Teilweise existieren auch in einem Kompartiment verschiedene Rab-Domänen. Proteine, die zur Degradierung bestimmt sind, werden über späte Endosomen den Lysosomen zugeführt. C) Mittlerweile weiß man, dass biosynthetische Proteine verschiedene endosomale Kompartimente auf dem Weg zu ihrer jeweiligen Membran passieren. HA: Influenza Hemagglutinin, VSV-G: Vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein, LDLR: *Low Density Lipoprotein Receptor*, TfR: Transferrin-Rezeptor, pIgR: polymerischer Immunglobulin-A-Rezeptor (modifiziert nach Gonzalez und Rodriguez-Boulan, 2009).

Seit einiger Zeit hat sich das Bild der separierten endosomalen und biosynthetischen Transportrouten gewandelt und es wurde erkannt, dass den endosomalen Kompartimenten in der Beförderung sekretorischer Produkte ebenfalls eine wichtige Bedeutung zukommt. Das endosomale Netzwerk ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich aufgebaut (Folsch *et al.*, 2009). In unpolaren Zellen wird endozytiertes Material in eine homogene Population früher Endosomen internalisiert und auch in eine homogene Gruppe von Recyclingkompartimenten weitergeleitet. In polaren Epithelzellen existieren je nach Membranbereich verschiedene frühe Sortier- und Recyclingendosomen, die sich durch die

Anwesenheit unterschiedlicher endosomaler Markerproteine auszeichnen und differenzieren lassen (siehe Abbildung 1.2; Gonzalez und Rodriguez-Boulan, 2009). So gibt es zunächst ein basolaterales und apikales Sortierkompartiment (BSE: *basolateral sorting endosome*; ASE: *apical sorting endosome*), die Material der jeweiligen Membran erhalten. Daneben ist ein gemeinsames Recyclingendosom (CRE: *common recycling endosome*) vorhanden, in das Material aus dem BSE und dem ASE transportiert wird. Dies gilt z. B. als Knotenpunkt beim transzytotischen Transportweg des pIgR oder im Recycling von TfR und LDLR. Spezifisch unterhalb der apikalen Domäne liegt ein weiteres Recyclingkompartiment (ARE: *apical recycling endosome*), das von Proteinen passiert wird, die vom CRE zur apikalen Membran befördert werden.

Identifizieren lassen sich die verschiedenen endosomalen Kompartimente durch eine Gruppe kleiner GTPasen, die als *Ras-related in brain* (Rab)-Proteine bezeichnet werden. Sie lokalisieren auf der zytoplasmatischen Seite der Membran, wo sie Bildung, Transport oder Fusionsereignisse von Vesikeln im endosomalen Netzwerk regulieren (Bhuin und Roy, 2014). Ein bekanntes Beispiel ist die Präsenz von Rab5 auf frühen Endosomen, wobei mit fortschreitender endosomaler Maturierung zu späten Endosomen eine Konversion zu Rab7 stattfindet (siehe Abbildung 1.2 B; Chavrier *et al.*, 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass sekretorische Proteine vom TGN nicht direkt die Plasmamembran erreichen, sondern zunächst durch verschiedene Endosomen transportiert werden (siehe Abbildung 1.2 C). Besonders für apikal befördertes Material wurden diese Kompartimente als wichtige Sortierstationen nach Verlassen des TGN identifiziert (zur Übersicht siehe Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009). So konnten Jacob und Naim zeigen, dass die beiden Enzyme LPH und SI in denselben Transportvesikeln das TGN verlassen, jedoch nachfolgend in einem *post*-Golgi endosomalen Kompartiment in distinkte Vesikelpopulationen segregiert werden (Jacob und Naim, 2001). Auch auf dem Weg zur apikalen Membran konnten Rab-Proteine der im Transport involvierten Endosomen charakterisiert werden. So durchlaufen manche apikale Membranproteine nacheinander Rab4-, Rab8 und Rab11-positive Kompartimente (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Besondere Beachtung kommt Rab11 seitens der Forschung zu, da diese GTPase mit dem ARE assoziiert ist, was mittlerweile als hauptregulatorisches Kompartiment für den apikalen Transport gilt (Welz *et al.*, 2014). Weitere Proteine, die apikal gelegene Endosomen passieren sind u. a. p75<sup>NTR</sup>, Megalin oder Endolyn (Marzolo *et al.*, 2003, Cresawn *et al.*, 2007, Guerriero *et al.*, 2008).

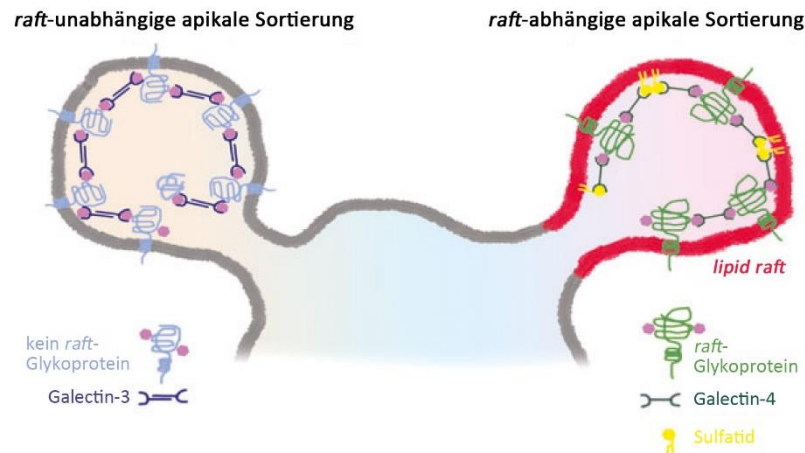
#### 1.2.4 Lipid rafts

Bislang ist nicht vollständig verstanden, von welchen Komponenten die Sortiersingale apikaler Proteine erkannt werden und was daraufhin zur Bildung distinkter Vesikelpopulationen führt. Für glykosylierte Proteine wurde die Beteiligung zuckerbindender Proteine, sogenannter Galectine, postuliert (Delacour *et al.*, 2006, Mo *et al.*, 2012). Ebenfalls soll die Assoziation mit Lipidmikrodomänen, sogenannten *lipid rafts* zu einer apikalen Beförderung führen. Dies sind lokale Membranbereiche, die im TGN entstehen und reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind und somit der Lipidkomposition der apikalen Domäne entsprechen (van Meer und Simons, 1988). Ein Merkmal der *lipid rafts* ist ihre Unlöslichkeit in nicht-

ionischen Detergenzien bei 4 °C, weshalb sie auch als Detergenz-resistente Membranen (DRM) bezeichnet werden. Es wurde herausgefunden, dass bestimmte Proteine vorzugsweise mit der Lipidkomposition der *rafts* interagieren und so in diesen Mikrodomänen akkumulieren, was zum Ausschluss nicht *raft*-assoziierter Proteine führt. Beispielsweise sammeln sich GPI-verankerte Proteine in *lipid rafts* an (Brown und Rose, 1992). Eine Depletion von Sphingolipiden und Cholesterin führte zu einer Fehlsortierung der GPI-Proteine, was die Bedeutung der *lipid rafts* für den apikalen Transport hervorhebt (Mays *et al.*, 1995). Derselbe Effekt wurde auch für HA beobachtet, welche zusammen mit NA in den Lipidmikrodomänen auf dem Weg zur apikalen Membran komplexiert (Keller und Simons, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Die Einteilung in einen *raft*-assozierten bzw. nicht *raft*-assozierten Transport kann in polaren Epithelzellen distal des TGN stattfinden. So weiß man, dass SI-positive Vesikel in Abhängigkeit von *lipid rafts* vom endosomalen Sortierkompartiment zur Plasmamembran gelangen, wohingegen LPH und p75<sup>NTR</sup> *raft*-unabhängig von dort befördert werden (Jacob und Naim, 2001, Delacour *et al.*, 2006). Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte *raft*-abhängige Sortierung scheint eine Oligomerisierung und Komplexbildung der zu transportierenden Proteine in den Lipidomänen zu sein. So werden GPI-verankerte Proteine, die sich nicht vernetzen können, zur basolateralen Membran fehlgeleitet (Hannan *et al.*, 1993, Paladino *et al.*, 2007). Dies könnte damit zusammenhängen, dass eine Oligomerisierung eine Krümmung der Lipidmembran einleitet und die Ausbildung von Transportvesikeln fördert.

### 1.2.5 Galectine

Mit den zuvor genannten Galectinen konnten Kofaktoren identifiziert werden, die eine Komplexbildung verschiedener Proteine ermöglichen. Galectine sind zuckerbindende Proteine, die zur Gruppe der Lektine gehören und  $\beta$ -Galaktose enthaltende Glykokonjugate verschiedener Proteine binden können (Barondes *et al.*, 1994). Spezifisch in *lipid rafts* wurde Galectin-4 gefunden, welches dort mit Glykanen der zu befördernden Proteine und Glykosphingolipiden (Sulfatide) der Membran interagiert und hochmolekulare Komplexe ausbildet (siehe Abbildung 1.3). Diese Interaktion wurde in einem *post*-Golgi endosomalen Kompartiment lokalisiert. Ein *knockdown* des Lektins führte zu einer intrazellulären Akkumulation der DRM-assozierten Proteine im sekretorischen Weg (Delacour *et al.*, 2005, Stechly *et al.*, 2009). Dies lässt darauf schließen, dass Galectin-4 im *lipid raft*-vermittelten apikalen Proteintransport bzw. Sortierprozess wirkt. Auch im *raft*-unabhängigen Transportweg konnte ein Vertreter der Lektine identifiziert werden, der dort eine vergleichbare Aufgabe zu Galectin-4 übernimmt. Hier wirkt Galectin-3 als Sortierrezeptor für die *lipid raft*-unabhängige Beförderung zur Plasmamembran (zur Übersicht siehe Hönig *et al.*, 2015). Ein *knockdown* dieses Lektins resultierte in der Fehlleitung von p75<sup>NTR</sup> und LPH zur basolateralen Membran, die *raft*-abhängig transportierte SI wurde hingegen nicht in ihrer apikalen Lokalisation beeinträchtigt (Delacour *et al.*, 2006). Es wird ferner postuliert, dass eine Komplexbildung des Transportguts mit Galectin-3 entscheidend für die Ausbildung apikaler Transportvesikel ist (siehe Abbildung 1.3; Delacour *et al.*, 2007). Der Ort, an dem Galectin-3 wirkt, wurde ebenfalls als ein *post*-Golgi endosomales Sortierkompartiment identifiziert (Schneider *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.3: Modell für die *lipid raft*-abhängige bzw. -unabhängige apikale Sortierung**

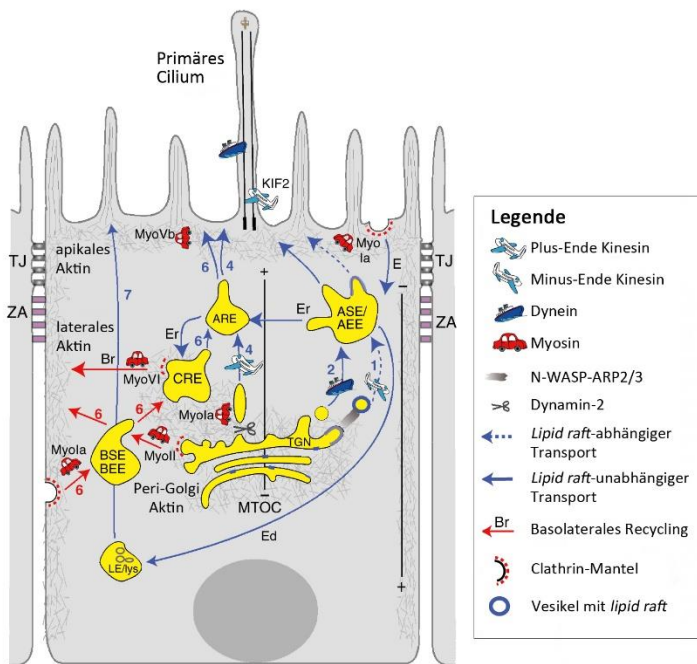
In einem *post*-Golgi endosomalen Kompartiment werden Glykoproteine je nach ihrer Abhängigkeit zu *lipid rafts* in unterschiedliche Vesikelpopulationen sortiert. Dabei konnte die Beteiligung unterschiedlicher Galectine festgestellt werden. Im *lipid raft*-unabhängigen Transport wirkt Galectin-3 als Sortierrezeptor für Glykoproteine. *Raft*-abhängige Glykoproteine werden mit Hilfe von Galectin-4 und Sulfatiden in größere Proteinkomplexe integriert (modifiziert nach Delacour *et al.*, 2009).

Das Lektin wurde im Lumen der endosomalen Membranstrukturen entdeckt, wobei es über keine klassische Signalsequenz verfügt, um in den sekretorischen Transportweg einzutreten. Galectin-3 wird zytosolisch synthetisiert und gelangt über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus der unkonventionellen Sekretion über die Plasmamembran ins apikale Medium polarer Epithelzellen (Mehul und Hughes, 1997, Thery *et al.*, 2001, Welton *et al.*, 2010). Im extrazellulären Milieu interagiert es mit einem noch nicht bekannten Rezeptor auf der Plasmamembran, wird nachfolgend internalisiert und gelangt so letztendlich ins endosomale Netzwerk, wo es mit neu synthetisierten Proteinen im Recycling-/Sortierkompartiment zusammentrifft (Straube *et al.*, 2013).

### 1.3 Zytoskelett und Motorproteine

Der gerichtete intrazelluläre Transport wird durch Komponenten des Zytoskeletts und damit assoziierter Proteine bewerkstelligt. Das Zytoskelett baut sich aus drei Hauptkomponenten auf: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Während Intermediärfilamente hauptsächlich eine strukturgebende Funktion vermitteln, sind das Aktin- und Tubulinzytoskelett neben ebendieser Funktion außerdem von entscheidender Bedeutung für aktive Transportprozesse innerhalb der Zelle.

Die Polarisierung von Epithelzellen spiegelt sich auch bei ihren darin enthaltenen Zytoskelettkomponenten wider. So findet man u. a. intrazelluläre Regionen, in denen Aktinfilamente gehäuft vorzufinden sind. Neben den basalen Stressfasern und dem apikalen Aktinring in der *Zonula adherens*, die zur mechanischen Stabilität des Epithels beitragen, existiert ein dichtes Aktinnetz unterhalb der apikalen Domäne (siehe Abbildung 1.4). Dieses Netz ist zum einen wichtig für die Integrität der Mikrovilli, zum anderen aber auch für die Endozytose oder den inter-endosomalen oder sekretorischen Transport (Lapierre *et al.*, 2001, Jacob *et al.*, 2003, Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005, Gautreau *et al.*, 2014). Bei der Beförderung zur basolateralen Membran wurde ebenso eine wichtige Rolle der Aktinfilamente



**Abbildung 1.4:**  
**Zytoskelettkomponenten und Motorproteine im polaren Proteintransport**

Mikrotubuli sind in polaren Epithelzellen in zwei Populationen organisiert: Stabile, laterale Mikrotubuli mit dem Minus-Ende an der apikalen Membran und dynamische Mikrotubuli die vom MTOC (*Microtubule Organizing Center*) ausgehen und der apikalen Membran mit Plus-Ende zugewandt sind. Aktinfilamente befinden sich unterhalb beider Membrandomänen, in den Mikrovilli und in der Golgi-Region. Unterschiedliche Motorproteine regulieren den Transport vesikulärer Komponenten entlang des Zytoskeletts (modifiziert nach Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009).

erkannt. So führte die Expression von dominant-negativem Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*), ein Aktin-regulierendes Protein, zu einer Störung des *post*-Golgi Transports oder des endosomalen Recyclings an dieser Membrandomäne (Kroschewski *et al.*, 1999, Musch *et al.*, 2001). Neben den Aktinfilamenten unterhalb der Plasmamembran scheint auch eine Aktinpopulation am TGN für den Export von apikalen Proteinen, wie p75<sup>NTR</sup> bedeutend zu sein. Auch hier resultierte die Beeinflussung von Aktinregulatoren wie Cdc42 oder LIMK1 (*LIM domain kinase 1*) in einer veränderten Transportrate des Neurotrophinrezeptors (Musch *et al.*, 2001, Salvarezza *et al.*, 2009).

Mikrotubuli weisen in polaren Epithelzellen ebenfalls eine besondere Organisation auf. Die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zusammengesetzten Strukturen entspringen in unpolaren Zellen dem perinukleär gelegenen MTOC (*Microtubule Organizing Center*) und breiten sich strahlenförmig in die Zellperipherie aus. Ihr Minus-Ende bleibt mit dem MTOC verbunden, während sich am Plus-Ende neue Tubulinoligomere anlagern, sodass Mikrotubuli in „Plus-Richtung“ wachsen. In polaren Epithelzellen existiert neben diesen klassischen Mikrotubuli eine weitere Population, die parallel zur lateralen Membran angeordnet ist (siehe Abbildung 1.4). Ihr Plus-Ende zeigt in Richtung der basalen Membran und ihr Minus-Ende ist somit der apikalen Domäne zugewandt (Bacallao *et al.*, 1989). Für das Erreichen der apikalen Membran nach Verlassen des TGN wird der Mikrotubuli-abhängige Transfer als essentiell erachtet. So werden LPH und SI zunächst entlang von Mikrotubuli in die apikale Region befördert (Jacob *et al.*, 2003). Auch der apikale Transport von p75<sup>NTR</sup>-positiven *post*-Golgi Vesikeln oder von HA und Annexin XIIIb wird durch dieses Zytoskelettelement vermittelt (Noda *et al.*, 2001, Jaulin *et al.*, 2007, Astanina und Jacob, 2010).

Damit die Beförderung entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli möglich ist, werden Motorproteine benötigt, die Transportvesikel und Zytoskelett miteinander verknüpfen und das Transportgut unter ATP-Hydrolyse gerichtet bewegen können. Beide Zytoskelettelemente werden von unterschiedlichen Motorproteinfamilien präferiert. Aktinfilamente werden von Myosinen gebunden, Mikrotubuli von Kinesinen und zytoplasmatischem Dynein (Vale, 1990, Vallee und Shpetner, 1990,



Ross *et al.*, 2008). Die beiden Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinfamilien weisen dabei eine Präferenz in ihrer Bewegungsrichtung auf. Während bislang nur Dyneine bekannt sind, die sich in Minus-Richtung bewegen, gibt es Kinesine, die Mikrotubuli in beide Richtungen begehen können (King, 2000, Hirokawa *et al.*, 2009). Für diverse apikale Transportvesikel konnte eine Beteiligung bestimmter Motorproteine aufgezeigt werden (siehe Abbildung 1.4). So führte die Inhibition von einem Kinesin-1 Motorprotein (Kif5B) zu einem Defekt in der apikalen Distribution von p75<sup>NTR</sup> (Jaulin *et al.*, 2007). Dieser Kif5B-abhängige Transportweg ist aber nur im polaren Stadium der Epithelzellen etabliert. Als weiterer Motor für p75<sup>NTR</sup>-tragende Vesikel im *post*-Golgi sekretorischen Weg konnte Kif5C in MDCK identifiziert werden (Astanina und Jacob, 2010). Darüber hinaus wurde mit KifC3 ein Minus-Ende-Motorprotein gefunden, welches Transportgut wie HA und Annexin XIIIb entlang der vertikalen Mikrotubulipopulation zur apikalen Membran leitet (Noda *et al.*, 2001).

#### 1.4 Die Entdeckung von Mx1 im apikalen Proteintransport

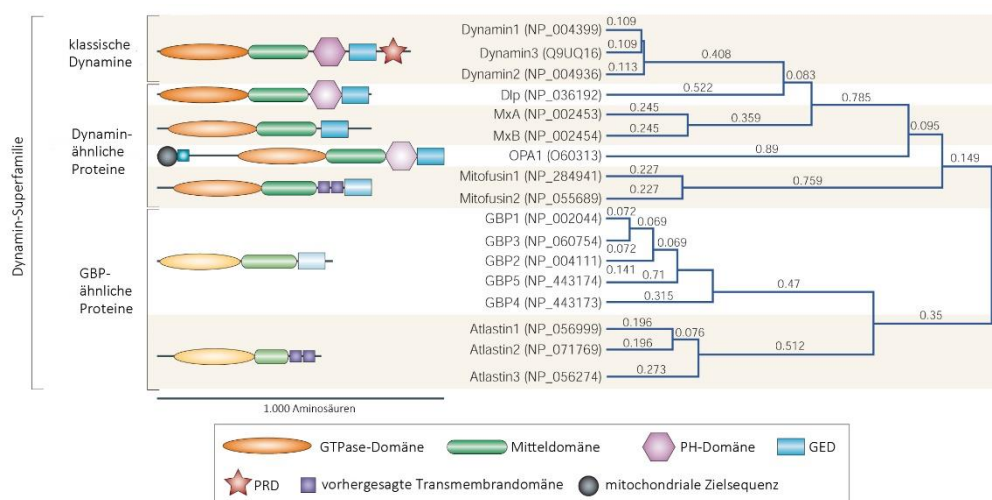
Wie im vorherigen Teil zu lesen ist, führen diverse komplexe Prozesse und Faktoren zu einem korrekten sekretorischen Transport eines Proteins zur bzw. über die Plasmamembran. Die dabei involvierten zellulären Komponenten sind mannigfaltig und in ihrer Funktion oder Zusammensetzung noch nicht vollständig aufgeklärt. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass im Proteintransport Elemente bedeutend sind, die bislang noch unbekannt sind. Zum besseren Verständnis, wie bestimmte Vesikelpopulationen zur Plasmamembran befördert werden, lassen sich diese Vesikel aus der Zelle isolieren und das darin enthaltene Proteom oder Lipidom analysieren. Dies wurde in einer vorhergehenden Studie für eine *post*-Golgi Vesikelpopulation, die *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Domäne befördert wird, durchgeführt (Greb, 2011). Christoph Greb konnte dabei zeigen, dass in bzw. an den immunisolierten Vesikeln zunächst verschiedene zu erwartende zelluläre Komponenten, wie Zytoskelettelemente und endosomale Marker vorkommen. Darüber hinaus konnte er ein Protein identifizieren, welches bislang nur wenig Beachtung im intrazellulären Proteintransport fand. Er sah, dass 5-15 Minuten nach Verlassen des TGN die große GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) auf p75<sup>NTR</sup>-tragenden Vesikeln vorzufinden ist. Ferner konnte er Mx1 zusätzlich auf LPH-positiven aber nicht SI-positiven Vesikeln nachweisen, was auf die gezielte Assoziation dieser großen GTPase mit dem *lipid raft*-unabhängigen Transportweg schließen lässt.



## 1.5 Die Dynamin-Superfamilie

Mx1 gehört zur Familie der Myxovirus-Resistenz (Mx)-Proteine, die wiederum der Dynamin-Superfamilie zugeordnet wird. Diese Superfamilie umfasst eine heterogene Gruppe von Proteinen mit vielfältigen zellulären Funktionen (zur Übersicht siehe Praefcke und McMahon, 2004). Verschiedene Vertreter dieser Familie sind in diversen Taxa zu finden: Angefangen bei ADL (*Arabidopsis thaliana* dynamin-like)-Proteinen in *A. thaliana*, über Vps1 (*Vacuolar protein sorting 1*) in *S. cerevisiae*, Dlps (*Dynamin-like proteins*) in *C. elegans* und *D. melanogaster* bis zu klassischen Dynaminen im *Homo sapiens*. Dabei ist das Vorkommen einer Proteingruppe nicht nur auf ein Taxon beschränkt, sondern sind z. B. im Menschen klassische Dynamine, Dlps, Mx-Proteine, OPA1 (*optic atrophy 1*), Mitofusine, GBPs (*Guanylate-binding proteins*) und Atlastine vorhanden.

Die Einteilung dieser Proteine in eine gemeinsame Superfamilie basiert auf einer Ähnlichkeit in ihrer Domänenarchitektur (siehe Abbildung 1.5). So enthalten sie eine große (~300 Aminosäuren) GTPase-Domäne (G-Domäne) und werden daher als große GTPasen bezeichnet, die sich so von den kleinen GTPasen (z. B. Rab-, Ran-, Ras-GTPasen) unterscheiden lassen. Zusätzlich besitzen sie eine Mitteldomäne (MD) und eine GTPase-Effektordomäne (GED), die in Oligomerisierungsprozessen und bei Regulierung der GTPase-Aktivität wichtig sind. Die einzigen Vertreter, die von dieser Struktur zum Teil abweichen sind die Atlastine, die keine GED besitzen. Auf Grund von Homologien in ihrer Kristallstruktur und der Evolution aus einem gemeinsamen Vorfahren, sind die Atlastine trotzdem in die Dynamin-Superfamilie eingeschlossen (Prakash *et al.*, 2000). Zusätzlich weisen manche Mitglieder weitere Domänen auf, die ihrem Wirkungsort bzw. ihrer Funktion entsprechen. So existiert z. B. in OPA1 eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz, wodurch OPA1 im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist und dort die Fusion und Division dieser Organellen



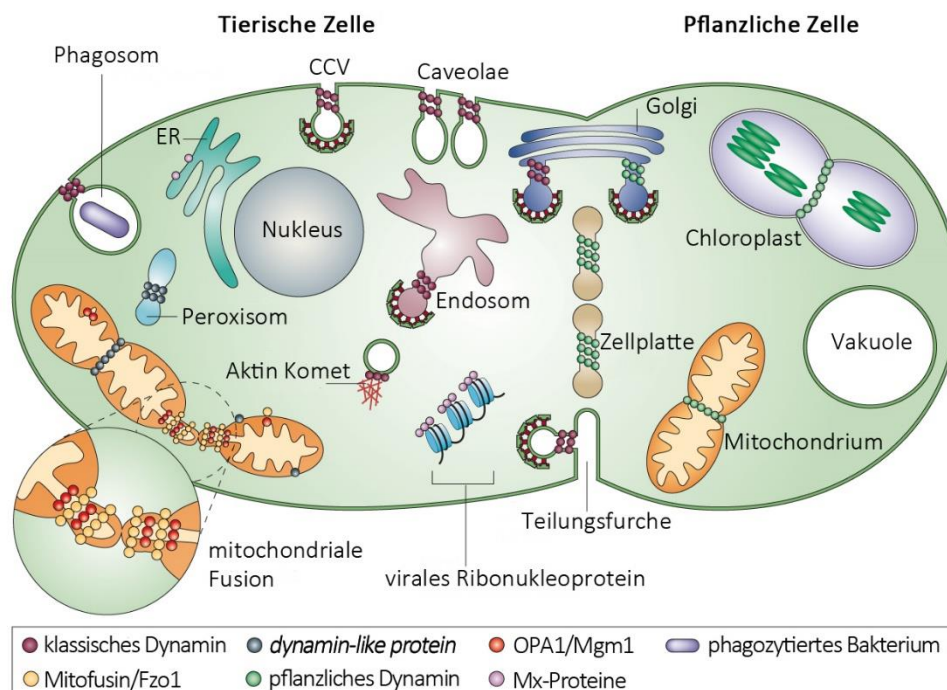
**Abbildung 1.5: Domänenstruktur der Dynamin-Superfamilie Mitglieder**

Alle Mitglieder der Dynamin-Superfamilie besitzen eine GTPase-Domäne, Mitteldomäne und eine GTPase-Effektordomäne (GED). Manche Proteine besitzen darüber hinaus noch eine Domäne zur Interaktion mit Lipidmembranen, wie z. B. eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne oder eine Transmembrandomäne. Klassische Dynamine können über ihre prolinreiche Domäne (PRD) mit anderen Proteinen interagieren. OPA1 besitzt eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz. Die abnehmende Farbintensität der Domänen veranschaulicht die abnehmende Sequenzhomologie. Dlp: *dynamin-like protein*, Mx: *myxovirus resistance protein*, OPA1: *optic atrophy 1*, GBP: *guanylate-binding protein* (modifiziert nach Praefcke und McMahon, 2004).

reguliert (siehe Abbildung 1.6; Olichon *et al.*, 2002). Ferner haben klassische Dynamine und Dlps eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne, mit denen sie an Lipidmembranen binden können (Yoon *et al.*, 2001, Low und Lowe, 2010). Diese Interaktion mit zellulären Membranen ist, neben der strukturellen Vergleichbarkeit, eine weitere Gemeinsamkeit von Proteinen dieser Superfamilie. Nicht alle Mitglieder besitzen dazu eine offensichtliche Lipidbindedomäne, Bereiche von anderen Domänen können diese Funktion ebenfalls übernehmen. Sie können durch diese Bindung die Membranen modellieren und steuern so Prozesse, die zur Umstrukturierung von Kompartimenten führen, wie z. B. bei der Teilung von Mitochondrien, Peroxisomen oder in pflanzlichen Zellen von Chloroplasten (siehe Abbildung 1.6). Darüber hinaus ist diese Superfamilie wichtig für die Abschnürung von Membranbereichen bzw. Vesikeln an verschiedenen zellulären Kompartimenten oder bei endozytotischen Vorgängen an der Plasmamembran.

### 1.5.1 Klassische Dynamine

Mit der Fähigkeit zur Membranfission besitzen die Mitglieder der Dynamin-Superfamilie eine große Bedeutung bei intrazellulären Transportvorgängen. Hier sind die klassischen Dynamine gut erforschte Beispiele um nachzuvollziehen wie es zur Bildung und Abschnürung von Transportintermediaten kommt. Dynamin wurde ursprünglich als Mikrotubuli-bindendes Protein im Mausgehirn identifiziert (Shpetner und Vallee, 1989). In etwa zur gleichen Zeit wurde gezeigt, dass eine Mutation des *shibire* Gens in *D. melanogaster* für einen Defekt bei der Abschnürung von endozytotischen Vesikeln an der



**Abbildung 1.6: Lokalisierung und Funktion der Dynamin-Superfamilie Mitglieder**

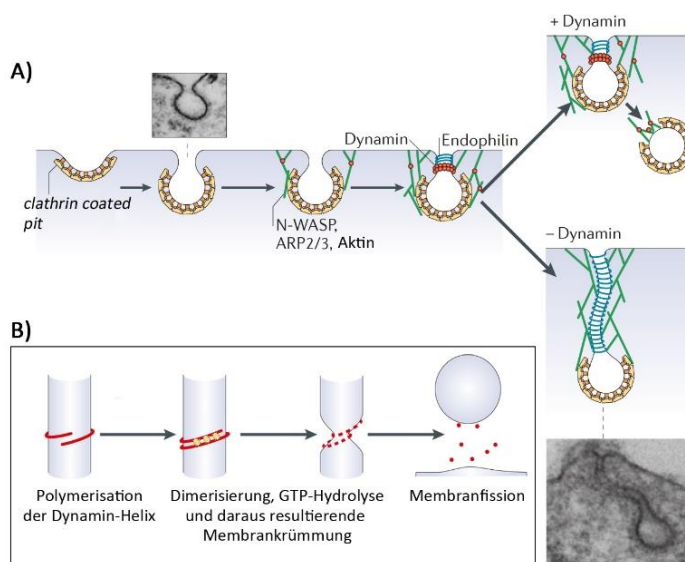
Klassische Dynamine und die weiteren Mitglieder der gemeinsamen Superfamilie üben in tierischen und pflanzlichen Zellen vielfältige Funktionen aus, bei denen es zur Modellierung von zellulären Membranen kommt. Typische Beispiele sind das Abschnüren von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCV) an der Plasmamembran oder die Steuerung mitochondrialer Fusion und Fission. ER: Endoplasmatisches Retikulum, CCV: clathrin coated vesicle, OPA1: optic atrophy 1, Mgm1: mitochondrial genome maintenance 1, Fzo1: fuzzy onions 1, Mx: myxovirus resistance protein (modifiziert nach Praefcke und McMahon, 2004).

Plasmamembran in Neuronen verantwortlich ist (van der Bliek und Meyerowitz, 1991). Man fand heraus, dass in diesem Gen ein Dynamin-Homolog codiert ist, wobei auch nachfolgend in neuronalen Zellen der Säugetiere der gleiche Phänotyp bei nicht funktionellem Dynamin beobachtet wurde (Takei *et al.*, 1995).

In Säugetieren existieren drei verschiedene Dynamin-Isoformen: Während Dynamin-1 ausschließlich in neuronalem Gewebe detektiert werden kann und Dynamin-3 neben Testis und Lunge ebenfalls hauptsächlich im Gehirn zu finden ist, wird Dynamin-2 ubiquitär exprimiert (Altschuler *et al.*, 1998). Klassische Dynamine enthalten neben den drei typischen Domänen (G-Domäne, Mitteldomäne, GED), die oben erwähnte PH-Domäne zur Lipidbindung und zusätzlich eine prolinreiche Domäne (PRD), mit der sie mit *Srv Homology* 3 (SH3)-Domänen anderer Proteine interagieren können (siehe Abbildung 1.6). Die Funktion von Dynamin wurde umfassend in der Endozytose studiert, wo unter Hilfe dieser großen GTPase Clathrin-umhüllte Vesikel (CCV: *clathrin coated vesicles*) entstehen (van der Bliek und Meyerowitz, 1991, Cook *et al.*, 1994, Altschuler *et al.*, 1998, Kasai *et al.*, 1999). Dynamin ist in der Lage zu oligomerisieren und durch die gleichzeitige Bindung an zelluläre Membranen Ringstrukturen zu formen, die eine Membranstreckung hervorrufen (siehe Abbildung 1.7). Dies alleine führt jedoch nicht zur Bildung eines CCV, sondern es werden zusätzliche Proteinkomponenten benötigt. So entstehen an der Plasmamembran durch die Interaktion von integralen Membranproteinen mit Adapterproteinen für die Mantelbildung (AP-2, AP180, Epsin) zunächst Clathrin-umhüllte Einstülpungen (CCP: *clathrin coated pits*). Die Membrankrümmung wird durch bestimmte Proteine, wie z. B. Endophilin oder Amphiphysin erkannt, welche sich an den Vesikelursprung anlagern und diesen stabilisieren (Altschuler *et al.*, 1998, McMahon und Boucrot, 2011). Über ihre SH3-Domäne können Endophilin und Amphiphysin Dynamin ebenfalls an die Membran rekrutieren.

Wie die Dynamin-Oligomerisierung letztendlich zur Abknospung des Vesikels führt ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass auch das Aktinzytoskelett, welches wie zuvor beschrieben, ein dichtes Netz unterhalb der Plasmamembran ausbildet, in die Endozytose involviert ist.

**Abbildung 1.7: Funktionsweise von Dynamin in der Clathrin-abhängigen Endozytose**



A) An der Invaginationsstelle von *clathrin coated pits* werden Aktin und Aktin-regulierende Proteine rekrutiert. Nachfolgend wird die eingeleitete Membrankrümmung von Endophilin erkannt und stabilisiert. Dynamin lagert sich an und führt zur Abschnürung des Vesikels. Ohne Dynamin entstehen lange Membranınvasionen. B) Die Polymerisation von Dynamin-Dimeren führt zur Bildung eines Rings um die tubuläre Membran. Wie die GTP-Hydrolyse und damit einhergehende Konformationsänderung des Proteins zur Membranfission führt, ist noch nicht vollständig verstanden (modifiziert nach Ferguson und De Camilli, 2012).

Während der Entwicklung von CCPs interagieren die beteiligten Komponenten mit Aktin-regulierenden Proteinen wie N-WASP (*neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein*) oder den Arp2/3 (*actin-related proteins* 2/3)-Komplex (McMahon 2011; Ferguson 2012). Aktin soll am Vesikelursprung die Einschnürung des CCP unterstützen und das letztendlich abgetrennte CCV von der Plasmamembran fortbewegen.

Neben der Clathrin-abhängigen Endozytose konnte ferner gezeigt werden, dass Dynamin-2 auch an der Abschnürung von Caveolae an der Plasmamembran beteiligt ist (Liu *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass diese große GTPase nicht nur zur Vesikelbildung an der äußeren Membran führt, sondern auch in Transportvorgängen im intrazellulären Raum eine Funktion ausübt. So lokalisiert Dynamin-2 am TGN, wo es an der Ausbildung von CCVs involviert ist und u. a. die Entstehung von p75<sup>NTR</sup>-positiven Vesikeln fördert (Jones *et al.*, 1998, Kreitzer *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011).

Die Fission von intrazellulären Membranbereichen wurde ferner für weitere Proteine der Dynamin-Superfamilie beobachtet. Drp1/Dlp1 ist ebenfalls am Golgi-Apparat zu finden, wo es zum einen die Morphologie dieses Kompartiments reguliert. Zum anderen ist es dort auch für die Abschnürung von Transportvesikeln verantwortlich, die für YFP-Glycan-GFP positiv sind und *lipid raft*-abhängig zur Plasmamembran befördert werden (Bonekamp *et al.*, 2010).

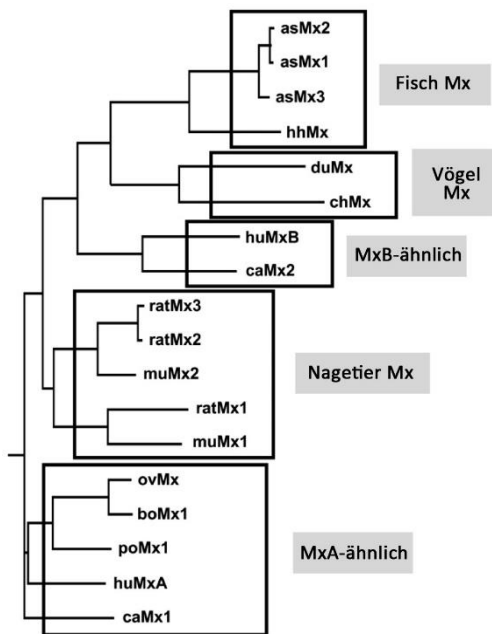
Die Bildung von Transportvesikeln ist, wie hier zum Teil dargestellt wurde, an vielen Membranen wie z. B. der Plasmamembran, im Golgi-Apparat oder auch am ER mittlerweile weitgehend aufgeklärt. Doch im umfangreichen Membransystem des endosomalen Netzwerks entstehen ebenso Transportintermediate, deren Entwicklung und die dafür wichtigen Komponenten noch nicht vollständig verstanden sind.

### 1.5.2 Mx-Proteine

Mx-Proteine, wie das von Christoph Greb auf *post*-Golgi Vesikeln gefundene Mx1, stellen eine besondere Unterfamilie innerhalb der Dynamin-Superfamilie dar. Sie heben sich von anderen Dynamin-Proteinen ab, da sie nicht durch eine Funktion im zellulären Transport bekannt sind, sondern in der Vermittlung einer antiviralen Immunantwort (Zur Übersicht siehe Verhelst *et al.*, 2013, Haller *et al.*, 2015).

Als erster Vertreter dieser Familie wurde das murine Mx1 durch Jean Lindenmann 1962 identifiziert (Lindenmann, 1962). Er beobachtete, dass Labormäuse einer bestimmten Inzuchtlinie (A2G) gegen eine normalerweise letale Dosis von Influenza A Viren eine Resistenz aufwiesen. Dies konnte man auf ein einzelnes Gen auf Chromosom 16 zurückführen, das in wildlebenden Mäusen intakt ist, aber in den meisten Laborzuchtstämmen deletiert oder mutiert ist (Stacheli *et al.*, 1988). Darüber hinaus fand man heraus, dass die durch Mx1 vermittelte virale Resistenz nur bei einer funktionellen Interferonantwort, induziert durch die Virusinfektion, gewährleistet ist. Mäuse, die mit einem Interferon-neutralisierendem Antiserum behandelt wurden, zeigten keinen Schutz gegen Influenza A Viren (Haller *et al.*, 1979). Somit wurde postuliert, dass die Expression von Mx1 strikt durch Interferon Typ I und Typ III reguliert ist und Mx1 daher zu den Interferon-stimulierten Genen (ISG) zählt (Haller *et al.*, 2007).

Mittlerweile weiß man, dass Mx-Proteine in Vertebraten hochkonserviert und in Fischen, Vögeln und Säugetieren zu finden sind (Haller *et al.*, 2015). Die meisten Säugetiere besitzen zwei Mx-Gene, die durch



**Abbildung 1.8: Phylogenetischer Baum der verschiedenen Mx-Proteine**

Die Mx-Proteine sind in fünf Untergruppen entsprechend ihrer Sequenzhomologie sortiert. As: atlantischer Lachs, hh: atlantischer Heilbutt, du: Ente, ch: Huhn, hu: Mensch, ca: Hund, rat: Ratte, mu: Maus, ov: Schaf, bo: Rind, po: Schwein (modifiziert nach Haller *et al.*, 2007).

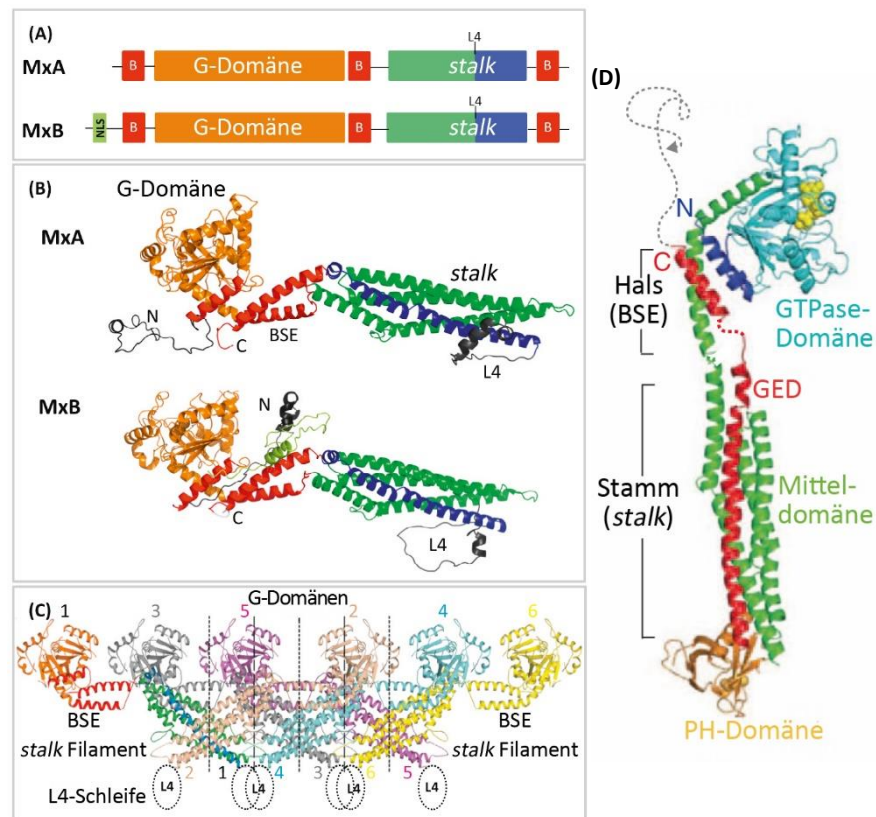
Genduplikation eines gemeinsamen Vorfahren entstanden sind und man daher in Mx1- und Mx2-Proteine in den verschiedenen Spezies differenziert (siehe Abbildung 1.8). Beim Menschen wird eine andere Nomenklatur verwendet, so wird Mx1 als MxA und Mx2 als MxB bezeichnet. In dieser Arbeit wird demgemäß auch z. B. zwischen caninem Mx1 und humanem MxA unterschieden. MxA ist des Weiteren näher verwandt zu seinen Mx1-Orthologen der anderen Spezies als zu MxB. Bei den Nagetieren gibt es eine Besonderheit, da hier das ursprüngliche Mx2-Gen verloren ging und das murine Mx2 ein Paralog des murinen Mx1 ist.

Mx-Proteine weisen wie die anderen Proteine dieser Superfamilie den typischen Aufbau aus N-terminaler GTPase Domäne, Mitteldomäne und C-terminaler GTPase Effektor-domäne auf, so zu sehen in Abbildung 1.9 am Beispiel von MxA (Haller *et al.*, 2015). Sie besitzen nicht die zusätzliche PH- oder PR-Domäne der klassischen Dynamine, wobei humanes MxB darüber

hinaus noch eine N-terminale Kernlokalisierungssequenz (NLS: *nuclear localization signal*) besitzt. Die dreidimensionale Kristallstruktur weicht stark von der linearisierten Form der Proteinsequenz ab. So lagern sich Elemente vom N- und C-Terminus mit einem Bereich aus der Mitte zusammen und bilden ein sogenanntes *Bundle-Signaling Element* (BSE). MD und GED formen gemeinsam die sogenannte *stalk*-Region, die durch das BSE von der G-Domäne separiert ist. Mx-Proteine sind durch integrierte Gelenke sehr flexibel und können sich über ihre *stalk*-Region zu Oligomeren zusammenlagern. Dimere wiederum lagern sich durch *stalk*-BSE-Interaktionen zu größeren multimeren Komplexen und Ringstrukturen zusammen (Accola *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2010). Durch diese Faltung und Oligomerisierungseigenschaften ähneln Mx-Proteine sehr dem klassischen Dynamin (siehe Abbildung 1.9 D), welches eine vergleichbare Kristallstruktur aufweist und sich ebenso in größere Komplexe zusammenlagert (Low und Lowe, 2010).

Mx1 besitzt nicht nur eine antivirale Aktivität gegen Influenza A, sondern gegen ein breites Spektrum von RNA- und auch einigen DNA-Viren (Verhelst *et al.*, 2013). Der Mechanismus, der letztendlich die Viren in ihrer Replikation behindert ist bislang noch unbekannt. Es wird vermutet, dass die intrazelluläre Lokalisation der Mx-Proteine mit ihrer antiviralen Aktivität im Zusammenhang steht (Haller *et al.*, 2015). So befindet sich murines Mx1 auf Grund einer NLS ebenfalls im Nukleus und inhibiert dort Viren, die sich in diesem Kompartiment replizieren. Dagegen zeigte es keine Wirksamkeit gegen Viren, deren Replikation im Zytoplasma stattfindet. Diese wurden von murinem Mx2 effektiv blockiert, welches im





**Abbildung 1.9: Struktur der humanen Mx-Proteine und humanem Dynamin-1**

A) Domänenstruktur von MxA und MxB. MxB besitzt im Gegensatz zu MxA eine N-terminale Kernlokalisierungssequenz (NLS). B) Kristallstruktur von MxA und vorhergesagte Struktur für MxB. C) Ansicht eines Oligomers aus sechs MxA-Monomeren. Sie sind verbunden durch *stalk-stalk*- bzw. *BSE-stalk*-Interaktionen. Gestrichelte Linien stellen die Schnittstellen zweier Monomere dar. D) Vorhergesagte Struktur für klassisches Dynamin, basierend auf humanem Dynamin-1 (GTPase-Domäne, Hals und PH-Domäne) und des MxA-Stamms (modifiziert nach Haller *et al.*, 2015 und Low und Löwe, 2010).

Gegensatz zu seinem Paralog außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Doch beim Menschen ist das zytosolisch vorliegende MxA wirksam gegen Viren, die sowohl im Kern als auch außerhalb replizieren, sodass hier kein eindeutiger Zusammenhang feststellbar ist. Des Weiteren fand man heraus, dass der antivirale Effekt von Mx1/MxA abhängig ist von einem funktionellen GTP-Zyklus, einer intakten BSE-Region und der Oligomerisierung zu größeren Einheiten (Haller *et al.*, 2015). Das BSE ist wichtig, da es als Vermittler zwischen der G-Domäne und der *stalk*-Region dienen soll und z. B. durch GTP-Hydrolyse induzierte Konformationsänderungen weitergibt (Rennie *et al.*, 2014). Jedoch ist die Inhibition vom z. B. Hepatitis B Virus (HBV) nicht abhängig von der GTPase-Aktivität, was verdeutlicht, dass die Wirkungsweise von Mx1 noch viele Fragen aufwirft. Lange Zeit ging man davon aus, dass das zweite humane Mx-Protein, MxB, keine antivirale Spezifität besitzt (Haller *et al.*, 2007). Doch neue Studien beweisen, dass diese große GTPase gegen Primaten-Lentiviren wirksam ist und z. B. die Integration des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV-1) ins Genom der Wirtszelle verhindern kann (Kane *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2013).

Ein Merkmal von Mx1 ist, wie bei den anderen Mitgliedern dieser Superfamilie, die Bindung an Lipidmembranen. Dies wird bei diesem Protein, welches keine PH-Domäne besitzt, durch die L4-Schleife ermöglicht (von der Malsburg *et al.*, 2011). So wurde zytoplasmatisches Mx1 in Assoziation mit

intrazellulären Membranen beobachtet, die positiv für COPI (*coat protein complex I*) waren und dem glatten ER zugeordnet werden konnten (Stertz *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann rekombinantes MxA ähnlich zu Dynamin an negativ geladenen Liposomen oligomerisieren und sie tubulieren (Accola *et al.*, 2002). Es besteht die Möglichkeit, dass der Kontakt mit Membranen bedeutend für die antivirale Aktivität ist. MxA bindet das LaCrosse Virus Nukleokapsidprotein oder fängt HBV Kapside ab und fehllokalisiert sie in ein perinukleäres Membrankompartiment, wodurch sie nicht mehr für die Virusreplikation zur Verfügung stehen (Reichelt *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2012).

Andere Studien zeigten, dass auch Nukleokapside des Thogoto Virus von Mx1 erkannt werden und diese dadurch im Zytoplasma akkumulieren (Kochs und Haller, 1999). Diese Fehlleitung von Viruskomponenten könnte auf einer Interaktion mit der zellulären Transportmaschinerie beruhen. Darüber hinaus scheint Mx1 nicht nur die intrazelluläre Lokalisation der Virusproteine verändern zu können, sondern auch in Transportwegen an der Plasmamembran eine Funktion auszuüben. So wird die Endozytose von Influenza A Viruspartikeln durch porcines Mx1 verhindert, indem der Transport von frühen zu späten Endosomen gehemmt wird (Palm *et al.*, 2010). Ferner führt die Überexpression von MxA zu einem gestörten endosomalen Recycling von Transferrin (Jatiani und Mittal, 2004). Auch MxB besitzt vermutlich eine Funktion in einem generellen Transportmechanismus. Es wurde aufgeklärt, dass dieses Protein an Kernporen vorzufinden ist und dort den Transfer zwischen Nukleus und Zytoplasma reguliert. Da dominant-negatives MxB den nukleären Import von einem NLS-Reporterkonstrukt blockiert, wird so möglicherweise auch die Aktivität gegen HIV-1 vermittelt (King *et al.*, 2004).

Interessanterweise können Mx-Proteine, trotz der postulierten strengen Regulation durch Interferon, in verschiedenen Zelllinien endogen detektiert werden. So ist MxB in HeLa-Zellen konstitutiv aktiv oder Mx1 ebenso in ovinen Drüsenepithelzellen (King *et al.*, 2004, Racicot und Ott, 2011). Auch in der polaren Epithelzelllinie MDCK, in der die Vesikelanalyse von C. Greb durchgeführt wurde, ist das canine Mx1 ohne vorherige Interferoninduktion konstitutiv vorhanden (Nakamura *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigt die große GTPase in MDCK-Zellen keine Wirksamkeit gegen Influenza A, was auf weitere Funktion dieses Proteins, außerhalb einer viralen Immunantwort, hindeuten könnte.

## 1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Der Mechanismus der antiviralen Aktivität der großen GTPase Mx1 ist bislang unverstanden, doch verschiedene Arbeitsgruppen postulieren, dass dieses Protein durch die Interaktion mit weiteren zellulären Komponenten diese Funktion erfüllen könnte. Bei der Suche nach neuen Faktoren im Proteintransport wurde Mx1 in polaren Epithelzellen auf *post*-Golgi Vesikeln des *lipid raft*-unabhängigen Transportwegs identifiziert.

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, in welchem Zusammenhang diese große GTPase zu verschiedenen Komponenten des intrazellulären Transports steht. Hierzu wurden zunächst verschiedene mikroskopische Analysemethoden verwendet, um die Assoziation von Mx1 mit *post*-Golgi Vesikeln in polaren Epithelzellen näher zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde Mx1 im Kontext zu diversen zellulären Markern, wie z. B. endosomalen Proteinen oder dem Zytoskelett visualisiert, um Aufschluss über die Lokalisation dieses Proteins zu erhalten. Zusätzlich sollte mit *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP)-Analysen und Lebendzellmikroskopie die Dynamik von Mx1 erfasst und gemessen werden, um sie mit anderen Proteinen der intrazellulären Transportmaschinerie vergleichen zu können. Auf dem biochemischen Weg sollte letztendlich aufgeklärt werden, ob Mx1 im biosynthetischen Transport von Bedeutung ist. Dazu wurde der Mx1-Gehalt in polaren MDCK-Zellen durch RNA-Interferenz herunterreguliert und verschiedene Transportstudien für apikal beförderte Proteine durchgeführt. Im letzten Teil der Arbeit sollte die Expression dieser großen GTPase in Abhängigkeit zur Zellpolarität und in verschiedenen zellulären Systemen untersucht werden. Da Mx1 anscheinend nicht nur in MDCK-Zellen ohne Interferoninduktion exprimiert wird, könnten so weitere Zelllinien mit konstitutiv aktivem Mx1 identifiziert werden. Dies könnte ein Hinweis für eine generelle Bedeutung der Mx-Proteine in zellulären Prozessen sein.



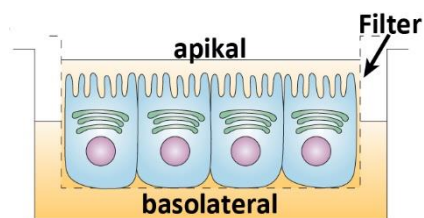
## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung von MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der Transportvorgänge in polaren Epithelzellen wurden in dieser Arbeit MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) II-Zellen als Modellzelllinie verwendet. MDCK-Zellen wurden vermutlich aus dem distalen Tubulus der caninen Niere isoliert und bilden in Zellkultur einen adhärenenten Zellrasen mit polarer Morphologie aus (Gaush *et al.*, 1966). Neben der standardisierten Kultivierung in Petrischalen, können MDCK-Zellen auch auf Filtereinsätzen in *Multiwell*-Platten ausgesät werden (siehe Abbildung 2.1). Bei dieser Kultivierungsmethode erreichen die Zellen einen hohen Polaritätsgrad, mit einem flüssigkeitsdichten *monolayer* durch stabile Zell-Zell-Verbindungen. Des Weiteren ist es so möglich in verschiedenen Studien Transportvorgänge an der apikalen oder basolateralen Domäne der Zellen separiert zu betrachten.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank mit desinfizierten Arbeitsutensilien und in einer kontrollierten mykoplasmenfreien Umgebung durchgeführt. MDCK-Zellen und alle weiteren verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank standardmäßig in 10 cm Plastik Kulturschalen mit 10 mL Kulturmedium kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Nährmedium gewechselt und beim Erreichen einer hohen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Die verwendeten Zelllinien und ihre Kulturmedien sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.



**Abbildung 2.1: Kultivierung von MDCK-Zellen auf Filtereinsätzen**

MDCK-Zellen bilden einen dichten und hochpolaren Zellrasen, wenn sie auf Filtereinsätzen kultiviert werden. Auf diese Weise ist auch eine separate Behandlung (z. B. eine Biotinylierung) beider Membrandomänen möglich (modifiziert nach Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005).

#### 2.1.2 Passagieren

Als Vorbereitung für die in dieser Arbeit durchgeführten verschiedenen Studien wurden die Zellen in unterschiedliche Kulturgefäße bzw. auf Deckgläschen oder Filtereinsätze ausgesät. Zusätzlich mussten die Zellkulturen bei hoher Konfluenz mit geringerer Dichte auf neue Kulturgefäße passagiert werden, um die Wachstumsphase der Zellen zu erhalten.

Ausgehend von einer 10 cm-Kulturschale wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL einer Trypsin-EDTA Lösung bei 37 °C inkubiert. Trypsin löst die Adhärenz der Zellen zum Kulturgefäß und die Zell-Zell-Verbindungen auf, EDTA wirkt als Calcium-Chelator und bindet Calciumionen, welche ebenfalls für die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen wichtig sind. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch überprüft, hiernach wurden 8 mL frisches Vollmedium hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Das im Medium enthaltene fetale Kälberserum (FKS) inaktiviert dabei die enzymatische Reaktion des Trypsins. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL

Falcon-Röhrchen überführt und bei 100 *g* für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 mL frischem Medium aufgenommen. Nun wurde das gewünschte Volumen der Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium pipettiert. Zur Fortführung einer MDCK-Kultur wurden z. B. 1 mL der Suspension auf eine neue 10 cm Kulturschale mit 9 mL Nährmedium überführt, die Zellen also im Verhältnis 1:10 gesplittet.

### **2.1.3 Einfrieren und Auftauen**

Zellkulturen können zur späteren Verwendung oder für eine langfristige Lagerung eingefroren und in flüssigem Stickstoff nahezu unbegrenzt aufbewahrt werden. Eine 10 cm Kulturschale mit 80-100-prozentiger Konfluenz wurde dafür zunächst zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen im Anschluss trypsiniert und in 1 mL Einfriermedium (Kulturmedium ohne Zusätze, mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und dieses mit einer Einfrierhilfe bei -80 °C mit 1 °C/min langsam herunter gekühlt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einen Stickstofftank eingelagert.

Zum Auftauen wurde ein Cryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und per Handwärme aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Falcon-Röhrchen mit 10 mL Kulturmedium pipettiert und bei 100 *g* für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 mL frischem Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Kulturschale ausgebracht.

### **2.1.4 Transfektion**

Das Einbringen und die Expression exogener DNA- oder RNA-Moleküle in eine Zellkultur bezeichnet man als Transfektion. In dieser Arbeit wurden verschiedene Transfektionstechniken angewendet, um z. B. fluoreszenzgekoppelte Markerproteine wie p75<sup>NTR</sup>-GFP zu exprimieren oder die Synthese von endogenem Mx1 mittels RNA-Interferenz herab zu regulieren.

### **2.1.5 DNA-Transfektion von MDCK-Zellen mittels Lipofektion**

Bei MDCK-Zellen wurde die Lipofektion verwendet, um Plasmid-DNA in die Zellen einzuschleusen. Bei diesem Prozess werden die negativ geladenen DNA-Moleküle in die kationischen Liposomen des Transfektionsreagenz (Lipofectamine 2000, Invitrogen) in einer vorangestellten Inkubation inkorporiert. Anschließend wird das Liposomen-DNA-Gemisch auf die Zellen pipettiert, die diese Komplexe mittels Endozytose internalisieren. Bislang ist nicht genau verstanden, wie die Plasmid-DNA nachfolgend aus dem Endomembransystem in den Zellkern gelangt und einer lysosomalen Degradierung entkommt.

Am Vortag der Transfektion wurden MDCK-Zellen im Verhältnis 1:4 auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und 24h inkubiert. Am Folgetag wurden je 1,5 mL MEM +/- (ohne Zusätze) mit 10,5 µL Lipofectamine 2000 oder 10 µg Plasmid-DNA zunächst getrennt angesetzt, nachfolgend zur Komplexbildung gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Derweil wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Transfektionsgemisch danach auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine sechsstündige

Inkubation, wonach das Transfektionsmedium entfernt wurde und die Zellen mit frischem Kulturmedium bis zur Verwendung weiter inkubiert wurden.

### 2.1.6 DNA-Transfektion von COS-7-Zellen mittels DEAE-Dextran

Analog zur Transfektion von MDCK-Zellen mit Lipofectamine 2000 wurde Plasmid-DNA in COS-7-Zellen mit dem kationischen Polymer Diethylaminoethanol (DEAE)-Dextran transfiziert. Hierbei binden die negativ geladenen DNA-Moleküle an das positive DEAE, welches an Dextran gekoppelt ist. Der Dextran-Komplex wird von den Zellen endozytiert und die Plasmid-DNA gelangt nach Verlassen der Endosomen in den Zellkern, wo sie transkribiert wird.

Für die Transfektion wurden COS-7-Zellen am Vortag je nach Konfluenz im Verhältnis 1:10-1:30 auf eine neue 10 cm Kulturschale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde der Transfektionsansatz bestehend aus 6 µg Plasmid-DNA und 48 µL 50x DEAE-Dextran in 2,4 mL DMEM -/- angesetzt und für 10 min bei RT inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit zweimal mit PBS gewaschen und der Transfektionsansatz im Anschluss auf die Zellen pipettiert. Die Kulturschale wurde für 1 Stunde (h) im Brutschrank inkubiert und danach das Transfektionsmedium durch Medium mit Chloroquin (10 mL DMEM mit 100 µL 100x Chloroquin und 10 % FKS) ersetzt. Chloroquin verhindert das Ansäuern der Endosomen, wodurch der Abbau der exogenen DNA durch saure Hydrolasen verringert werden soll. Die Zellen wurden daraufhin für 4 h im Brutschrank inkubiert, das Chloroquinmedium wurde abgesaugt und 10 mL Vollmedium zur weiteren Kultur hinzugefügt. Bis zur Verwendung wurden die Zellen im Brutschrank gelagert.

### 2.1.7 siRNA-Transfektion von MDCK-Zellen

Mit Hilfe der RNA-Interferenz kann die Synthese eines Proteins von Interesse herunterreguliert werden. Dazu werden kurze (19-23 Basenpaare) RNA-Oligonukleotide synthetisiert, die komplementär zu einer *messenger* RNA (mRNA)-Sequenz des entsprechenden Proteins sind. Im Zytosol führen die als *small interfering* RNA (siRNA) bezeichneten Oligonukleotide zur Assemblierung des *RNA-induced silencing complex* (RISC), in dem endogene zelluläre Proteine, siRNA und mRNA zusammengeführt werden. Die siRNA bindet dort an die komplementäre mRNA, was in der mRNA-Degradierung resultiert und somit die Synthese des Proteins unterbunden wird. Je nach Spezifität und Effizienz der siRNA wird die Synthese des Proteins unterschiedlich stark verringert, sodass man von einem *knockdown* im Gegensatz zu einem kompletten genetisch-induzierten *knockout* spricht. In dieser Arbeit wurde siRNA gegen Mx1 verwendet und mittels Lipofektion in MDCK-Zellen transfiziert, um eine mögliche Funktion dieser großen GTPase im Transport verschiedener Proteine zu überprüfen.

Am Tag vor der Transfektion wurden MDCK-Zellen im Verhältnis 1:3 in eine Kulturschale oder auf Filtereinsätze ausgesät. Am Folgetag wurden 150 pmol siRNA und 7 µL Lipofectamine 2000 zunächst getrennt in je 1 mL Transfektionsmedium angesetzt und dann gemischt. Der Ansatz wurde zur Komplexbildung für 10 min bei RT inkubiert und die Zellen derweil zweifach mit PBS gewaschen. Hiernach wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und diese für 5 h im Brutschrank

inkubiert. Danach wurde das Medium durch Vollmedium ersetzt und die Zellen bis zum Versuchstag weiter inkubiert. Zur Erhöhung der *knockdown*-Effizienz wurde die siRNA-Transfektion am nächsten oder übernächsten Tag wiederholt. Um einen unspezifischen Einfluss der Transfektionsmethode auf die Zellen auszuschließen, wurde bei jeder Transfektion eine Kontrolltransfektion ohne spezifische siRNA durchgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Kulturmedien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Kulturmedium</b>
Caco-2	Humane Kolonkarzinomzelllinie	DMEM (Glukose: 4,5 g/L) mit
		FKS 20 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
COS-7	Fibroblastenzelllinie aus der Niere der grünen Meerkatze	DMEM (Glukose: 1 g/L) mit
		FKS 10 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
HeLa	Humane Epithelzelllinie des Zervixkarzinoms	MEM mit
		FKS 10 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
HK-2	Immortalisierte Nierenepithelzelllinie aus der humanen Niere	DMEM (Glukose: 4,5 g/L) mit
		FKS 20 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
MDCK	Canine Nierenepithelzelllinie	MEM mit
		FKS 5 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
MDCK stabil transfiziert	MDCK-Zellen, die stabil exogene Fusionsproteine wie z. B. p75 <sup>NTR</sup> -GFP oder Mx1-GFP in ihr Genom integriert haben und konstitutiv exprimieren	MEM mit
		FKS 5 % (v/v)
		Penicillin/Streptomycin (100x) 1 % (v/v)
		L-Glutamin (100x) 1 % (v/v)
		G418 0,5 mg/mL

Tabelle 2.2: Medien und Puffer für die Zellkultur

Medium / Puffer	Zusammensetzung
Kultur- bzw. Vollmedium	DMEM oder MEM mit FKS, PSG, (G418) (siehe Tabelle 2.1)
Einfriermedium	DMEM oder MEM ohne Zusätze FKS 20 % (v/v) DMSO 10 % (v/v)
Transfektionsmedium	DMEM oder MEM ohne Zusätze 7 µL/mL Lipofectamine 2000 (MDCK) oder 20 µL/mL 50x DEAE-Dextran (COS-7)
Chloroquinmedium	DMEM ohne Zusätze FKS 10 % (v/v) Chloroquin (100x) 10 µL/mL
PBS (1x)	NaCl 140 mM KCl 2,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM pH 7,35

Tabelle 2.3: verwendete Plasmide / siRNA

Plasmid	Beschreibung
Mx1-GFP	canines Mx1 in pEGFP-C2
cMx1	canines Mx1 in pCMV-Tag1
p75-GFP	humanes p75 <sup>NTR</sup> in pEGFP-N1
p75-DsRed	humanes p75 <sup>NTR</sup> in pDsRed-N1 Monomer
p75 <sub>SNAP</sub>	humanes p75 <sup>NTR</sup> mit SNAP-tag aus pSNAP-tag(m)
SI-YFP	humane SI in peYFP (peYFP-SI)
GT-DsRed	humane β 1,4-Galaktosyltransferase in pDsRed Monomer
Tubulin-mCherry	humanes Tubulin in pEF-mCherry (pEF-mcherry-Tubulin)
siRNA	Beschreibung
Mx1 siRNA	siRNA gegen canines Mx1, synthetisiert von Ambion (Life Technologies, Carlsbad, USA) 5' -AUGGAGCGCUGUGAUUGAATT-3' ( <i>sense</i> ), 5' -UUCAAUCACAGCGCUCCAUTT-3' ( <i>antisense</i> )
BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA	unspezifische, rot fluoreszierende siRNA zur Transfektionskontrolle (Life Technologies, Carlsbad, USA)

## 2.2 Biochemie

### 2.2.1 Herstellen von Zelllysaten

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Studien wurden Zelllysate erstellt, um eine Proteinanalyse mittels nachfolgender Gelelektrophorese und Westernblot zu ermöglichen. Eine 10 cm Kulturschale wurde hierfür zunächst auf Eis zweifach mit PBS gewaschen und im Anschluss 1 mL Lysepuffer mit 10 µL/mL Proteaseinhibitoren (PI) auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und mit dem Puffer in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde über Kopf bei 4 °C für 30 min inkubiert, um die zellulären Membranen zu lösen. Danach wurde das Lysat bei 17000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um Zellkerne und Debris vom proteinreichen Überstand zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiter verwendet oder bei -20 °C zur späteren Verwendung eingefroren.

Standardlysepuffer		Proteaseinhibitoren	
Tris (pH 7,5)	25 mM	Lösung 1:	PMSF (3,4 mg/mL in DMSO)
NaCl	100 mM	Lösung 2:	20 µL Pepstatin (1 mg/mL in DMSO)
EDTA	1 mM		20µL Antipain (1 mg/200 µL in DMSO)
EGTA	1 mM		20µL Leupeptin (1 mg/200 µL in PBS)
Triton X-100	1 % (v/v)		20µL Aprotinin (1 mg/mL in PBS)
NP-40	0,5 % (v/v)		20µL Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor (25 mg/500 µL in PBS)
		Gebrauchslösung: 25 µL Lösung 1 + 500 µL Lösung 2	

### 2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Lowry ist es möglich quantitativ die Gesamtproteinkonzentration in einem Zelllysate zu bestimmen (Lowry *et al.*, 1951). Das Prinzip basiert auf einer Zweischnitt-Reaktion zwischen Kupfer-Ionen des Reagenz und den Peptiden des Lysats, bei der proportional zur Proteinmenge eine Blaufärbung entsteht, die photometrisch gemessen wird. Um die Proteinmenge im Anschluss quantifizieren zu können, wird eine Standardreihe mit einer zuvor definierten BSA (Bovines Serumalbumin)-Menge (0,4-2,4 µg/µL) bei der Messung mitgeführt.

Für die Proteinbestimmung wurde das *DC Protein Assay Kit* von BioRad verwendet. Alle Messungen wurden in einer 96-well Platte im Triplikate durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde vorab Lösung S mit Lösung A im Verhältnis 1:50 gemischt (= Lösung A'). 20 µL Lösung A' wurden dann zu 5 µL des Zelllysats in die Mikrotiterplatte pipettiert, wonach 200 µL Reagenz B hinzugefügt wurden. Nach einer ca. 10 minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln wurde mit dem Tecan infinite M200 die Lichtabsorption bei 750 nm gemessen. Zusätzlich zur Standardreihe wurde die Absorption eines Leerwerts (nur Lysepuffer mit Reagenz) bestimmt, um eine eventuelle unspezifische Färbereaktion des Lysepuffers von

den Messwerten subtrahieren zu können. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurde eine Ausgleichsgerade für den BSA-Standard erstellt, um so den Proteingehalt der Lysate ableiten zu können.

### 2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist ein Verfahren um Proteine, z. B. aus einem Lysat, ihrem Molekulargewicht entsprechend in einer Gelmatrix aufzutrennen. Dazu findet in dieser Arbeit die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli Verwendung (Laemmli, 1970). Proteine werden hier zunächst in einem Sammelgel auf eine Bande fokussiert, um nachfolgend gleichzeitig in das eigentliche Trenngel einzutreten, in dem sie ihrer Größe nach separiert werden. Je nach dem in welchem Kilodalton (kDa)-Bereich die aufzutrennenden Proteine liegen, kann durch das Anpassen der (Bis)Acrylamidkonzentration die Porengröße des Gels verändert werden. Eine niedrige Konzentration (5-8 %) resultiert in einem weitmaschigen Gel, wodurch Proteine mit einem höheren Molekulargewicht besser aufgetrennt werden. Möchte man kleinere Proteine im Gel separieren, sollten höhere (12,5-18 %) (Bis)Acrylamidkonzentrationen verwendet werden. Durch den überschüssigen Einsatz von SDS im Proben- und Elektrophoresepuffer wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch alle Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Nach Anlegung einer elektrischen Spannung wandern die Proteine so zum positiven Pol durch das Gel, wobei kleinere Proteine schneller durch die Poren gelangen als größere und dadurch das typische Bandenmuster entsteht. Bei den meisten hier durchgeführten Experimenten, wie z.B. bei vergleichenden Expressionsanalysen oder der *knockdown*-Evaluation wurden gleiche Proteinmengen (20 µg) aufgetragen.

Vor der SDS-PAGE wird das Trenngel mit der gewünschten (Bis)Acrylamidkonzentration hergestellt und mit dem Sammelgel überzogen (siehe Tabelle 2.4). Zur Polymerisation der Gele werden Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) verwendet. Das fertige Gel wird in die Laufkammer eingesetzt, welche mit einem elektrisch leitfähigen Elektrophoresepuffer gefüllt wird. Zur Vorbereitung werden die aufzutragenden Proteinproben, z. B. Zelllysate, mit Proben- bzw. Laemmli-puffer versetzt. Dieser enthält neben dem zuvor genannten SDS auch Dithiothreitol (DTT), welches die Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion spaltet. Zusätzlich werden die Proteine durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C denaturiert, sodass letztendlich linearisierte Polypeptide in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Die Fokussierung im Sammelgel wurde durch das Einlaufen der Proben bei 80 V für ca. 20 min erreicht. Danach wurde die Spannung auf ca. 180 V erhöht bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Durch die Zugabe von Bromphenolblau in den Probenpuffer ließ sich die Lauffront im Gel verfolgen. Zusätzlich zu den eigenen Proben wurde der farbige Proteinstandardmarker *Precision Plus Protein Prestained Standard (Dual Color)* (BioRad) aufgetragen, um eine erfolgreiche Auftrennung überprüfen und die Größe der eigenen Proteine ableiten zu können.

Tabelle 2.4: Pipettierschema für SDS-PAGE-Gele (10 mL) unterschiedlicher Acrylamidkonzentration

	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	4,6 mL	4,0 mL	3,3 mL	2,1 mL
<b>30 % PAA-Mix</b>	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL	500 µL
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
<b>1,0 M Tris (pH 6,8)</b>	-	-	-	380 µL
<b>10 % SDS</b>	100 µL	100 µL	100 µL	30 µL
<b>10 % APS</b>	100 µL	100 µL	100 µL	30 µL
<b>TEMED</b>	6 µL	4 µL	4 µL	3 µL

**3x Laemmli-Puffer**

SDS	6 % (w/v)
Glycerin	30 % (w/v)
Tris-HCl, pH 6,8	150 mM
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
DTT	150 mM

**Elektrophoresepuffer**

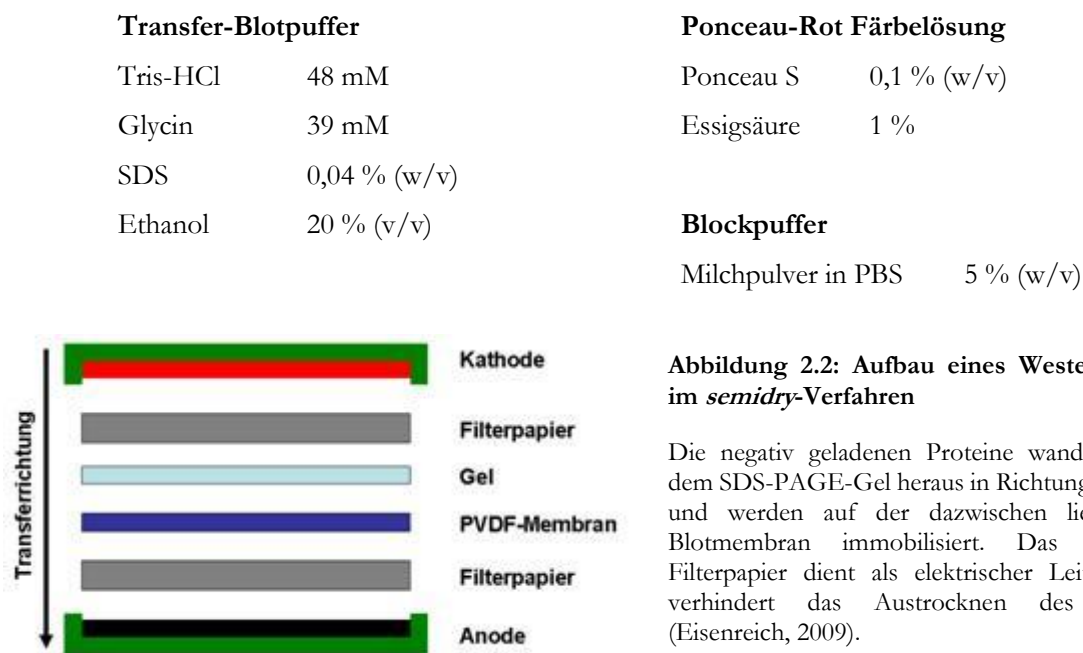
Tris	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 % (w/v)

**2.2.4 Westernblot**

Im Anschluss an die SDS-PAGE können Proteine durch das Westernblotverfahren aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, auf der sie durch Immundetektion visualisierbar sind. Zum Einsatz kam hier die *semidry*-Methode bei der das Polyacrylamidgel auf die Blotmembran gelegt wird und senkrecht dazu ein elektrisches Feld aufgebaut wird (siehe Abbildung 2.2). Die Anode befindet sich dabei hinter der Blotmembran, sodass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern und auf ihr durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen immobilisiert werden. Das Gel und die Membran sind in Transferpuffer getränktem Filterpapier eingefasst, um vor einer Austrocknung zu schützen und eine elektrische Leitfähigkeit zu gewährleisten. Der Transfer wurde bei 12 V und 400 mA für 45-60 min durchgeführt. Danach wurde die Membran mit PonceauS gefärbt, ein Farbstoff der unspezifisch und reversibel an Proteine bindet und somit der Transfer auf die Blotmembran überprüft werden kann. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen der Proteine zu maskieren. Dies verhindert, dass der nachfolgend zugegebene Primärantikörper unspezifische Epitope erkennt und so nur an das zu detektierende Peptid bindet. Der Primärantikörper (siehe Tabelle 2.6) wurde in Blockpuffer verdünnt und entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem Blot inkubiert. Danach wurde der Blot viermal für 10 min mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Als nächstes wurde der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.7), verdünnt in PBS, für 1 h bei RT auf den Blot gegeben. Nach viermaligen Waschen mit PBS für 10 min wurden die Proteinbanden mit Hilfe des *SuperSignal West*



*Dura Extended Duration Substrate*-Kits von Thermo Fisher Scientific visualisiert. Dazu wurden je 100 µL der Peroxid-Lösung und der *Enhancer*-Lösung mit 1 mL PBS gemischt und die ECL-Lösung gleichmäßig auf dem Westernblot verteilt. Die durch die enzymatische Umsetzung des Peroxidasesubstrats entstandenen Lichtsignale wurden mit dem *Chemostar Professional System* (Intas) detektiert. Zur Quantifizierung der Westernblots wurde die Software *LabImage 1D* von Kapelan Bio-Imaging verwendet.



### 2.2.5 (Co-)Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) werden Proteine spezifisch mit Hilfe von Antikörpern aus einem Zelllysats isoliert, um z. B. bestimmte Proteine für die SDS-PAGE anzureichern. Bei der Isolierung eines Proteins ist es auch möglich seine Bindungspartner zu identifizieren, da unter bestimmten Bedingungen ganze Proteinkomplexe intakt bleiben. Werden mehrere miteinander interagierende Proteine durch eine IP detektiert, bezeichnet man dies als Co-IP. In dieser Arbeit wurde sowohl die Spezifität der verwendeten Mx1-Antikörper durch eine einfache IP überprüft, als auch eine mögliche Interaktion mit Zytoskelettkomponenten mittels Co-IP analysiert.

Dazu wurde eine 10 cm-Kulturschale mit polaren MDCK-Zellen mit 1 mL PBS abgeschabt und die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Pelletierung bei 500 g und 4 °C für 3 min. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 mL PBS resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor zentrifugiert und erneut gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 300 µL Lysepuffer mit 10 µL PI gelöst und 30 min auf Eis zur Lyse inkubiert. Alle 10 min wurden die Zellen zusätzlich resuspendiert. Danach wurde Debris bei 17000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µL Waschpuffer, wurde zunächst ein kleiner Teil (ca. 20 µL) der Lysatprobe zur späteren Verwendung eingefroren. Im Folgenden wurde ein *preclearing* durchgeführt, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die zur Isolation der Immunkomplexe

verwendeten Agarosebeads binden. Dafür wurden 20 µL A/G<sup>+</sup>-beads zum Lysat pipettiert und dieses 1 h bei 4 °C über Kopf inkubiert. Hiernach folgte eine Zentrifugation bei 1500 g und 4 °C für 3 min. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1-2 µL des Antikörpers versetzt, der an das zu präzipitierende Protein bindet. Die Ausbildung der Immunkomplexe wurde für 1 h bei 4 °C über Kopf ermöglicht. Im Anschluss wurden 20 µL A/G<sup>+</sup>-beads hinzupipettiert und für 1 h weiter inkubiert. Währenddessen wurden die *preclearing-beads* dreimal mit 500 µL Waschpuffer und einmal mit 500 µL PBS gewaschen und dabei wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden 40 µL 3x Laemmli-Puffer auf die *beads* pipettiert. Die *beads* mit den gebundenen Immunkomplexen wurden ebenso gewaschen und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden hiernach bei -20 °C gelagert oder 10 min bei 95 °C aufgeköcht, wodurch die Proteinkomplexe von den *beads* eluiert wurden, um sie in der SDS-PAGE auf ein Gel aufzutragen. Als Negativkontrolle wurden Lysate verwendet, die nur mit A/G<sup>+</sup>-beads ohne den spezifischen Antikörper inkubiert wurden.

#### (Co-)IP-Lysepuffer (pH 7,4)

NaCl	150 mM
EDTA	4 mM
NP-40	1 % (w/v)
HEPES	250 mM

#### (Co-)IP-Waschpuffer (pH 7,4)

NaCl	150 mM
EDTA	4 mM
HEPES	250 mM

### 2.2.6 Oberflächen-IP

Die Oberflächen-IP stellt eine besondere Form der IP dar, bei der nicht erst im Zelllysate Proteine durch Antikörper gebunden werden, sondern bereits an der Membran der noch vitalen Zellen. Das Ziel dieses Experiments war die Analyse, ob Mx1 im biosynthetischen Transport von p75-GFP zur apikalen Membran eine Funktion ausübt. Dazu wurde in polaren MDCK-Zellen Mx1 mittels siRNA zunächst depletiert. Neu synthetisierte Proteine des exozytotischen Transportwegs wurden durch eine radioaktive Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin vom bereits vorhandenen Proteinpools unterschieden. Durch die Zugabe eines Antikörpers, welcher die exoplasmatische Domäne von p75-GFP erkennt, konnte der membrangebundene Anteil des Neurotrophinrezeptors immunmarkiert werden. Erst danach wurden die Zellen lysiert. Nun wurden die Immunkomplexe aus dem Lysat präzipitiert und im Anschluss intrazellulär verbliebendes p75-GFP ebenfalls durch eine IP isoliert. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie visualisiert.

Vor der Oberflächen-IP wurden MDCK\_p75-GFP-Zellen auf 6-well Filter ausgesät und mit siRNA gegen Mx1 transfiziert oder kontrollbehandelt und bis zu ihrer Polarisierung kultiviert. Am Tag der Oberflächen-IP wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und mit methioninfreiem Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches Medium, erneut ohne Methionin, ersetzt und die Zellen im Isotopenlabor radioaktiv markiert. Hierfür wurden 60 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin basolateral zu den Zellen pipettiert und diese für 15 min bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurde das Medium abgesaugt, durch DMEM (mit FKS und PSG) ersetzt und die Zellen für einen TGN-Block für

4 h bei 20 °C inkubiert. Es folgte ein Transfer auf 37 °C für unterschiedliche Zeitpunkte, um die akkumulierten Proteine aus dem TGN zu entlassen. Ab hier wurden die Zellen auf Eis gelagert und die *wells* zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 500 µL PBS zur apikalen Domäne und 1 mL PBS zur basolateralen Domäne, wurden apikal 2 µL p75-Antikörper (ME 20.4) hinzupipettiert. Die Bindung des Antikörpers an den extrazellulären Teil des Proteins wurde bei 4 °C für 2 h schwenkend ermöglicht. Folgend wurde das PBS abgesaugt und die Zellen fünfmal mit PBS +0,1 % BSA und zweimal nur mit PBS gewaschen. Hiernach wurden 500 µL Lysepuffer mit 10 µL PI auf die Zellen gegeben, diese abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4 °C in einem Überkopfschüttler wurden Zelltrümmer für 15 min bei 17000 g und 4 °C abzentrifugiert. Ein kleiner Teil des Überstands wurde als Lysatprobe abgenommen und mit Laemmli-puffer versetzt bei 20 °C eingefroren. Der restliche Überstand wurde mit 70 µL Protein-A-Sepharose (PAS)-*beads* über Nacht bei 4 °C über Kopf inkubiert. Am nächsten Tag wurde die PAS-*beads* abzentrifugiert (2 min bei 1500 g und 4 °C) und der Überstand mit dem intrazellulären p75-GFP in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die *beads* wurden zweifach je mit Waschpuffer I bzw. II gewaschen. Zum zuvor abgenommenen Überstand wurden 1,5 µL GFP-Antikörper hinzugefügt und für 2 h bei 4 °C über Kopf inkubiert. Nach Zugabe von 70 µL PAS zur Immunkomplexbindung wurde für 2 h weiter inkubiert. Die PAS-*beads* wurden wie zuvor zentrifugiert und gewaschen. Alle *beads* wurden mit 35 µL Laemmli-puffer versetzt und entweder für die SDS-PAGE vorbereitet oder zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Nach der SDS-PAGE auf einem 10-prozentigen Polyacrylamidgel wurde das Gel in Fixierlösung für 45 min bei RT gelagert. Hiernach wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt, mit Klarsichtfolie überdeckt und bei 78 °C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen Radiographiescreen gelegt und in einer Kassette für mindestens 2 Tage gelagert. Der belichtete *screen* wurde danach in einem Radioluminografie-Scanner ausgelesen und die Gele mit *LabImage 1D* quantifiziert. Mit den abgenommenen Lysatproben wurde ebenfalls eine SDS-PAGE mit angeschlossenen Westernblot durchgeführt und mit einem Mx1-Antikörper die *knockdown*-Effizienz der einzelnen Proben überprüft.

**(Oberflächen-IP) Lysepuffer (pH 8)**

Tris	25 mM
NaCl	50 mM
Na-Desoxycholat	0,5 % (w/v)
Triton X-100	0,5 % (w/v)

**Waschpuffer I**

Triton X-100	0,5 % (w/v)
Na-Desoxycholat	0,05 % (w/v)
in PBS	

**Fixierlösung**

Isopropanol	25 % (w/w)
Essigsäure	10 % (w/w)

**Waschpuffer II (pH 8)**

NaCl	500 mM
Tris	125 mM
EDTA	10 mM
Triton X-100	0,5 % (w/v)

**Antikörper**

anti-p75 (ME 20.4)	André Le Bivic
anti-GFP ( <i>full length</i> )	Clontech

### 2.2.7 Oberflächen-Biotinylierung

Die Oberflächen-Biotinylierung ist eine weitere Methode, um den Einfluss von Mx1 auf den apikalen Transport zu studieren. Analog zur Oberflächen-IP wurde ein Mx1-*knockdown* durchgeführt und neu synthetisierte Proteine radioaktiv markiert. Statt eines Antikörpers wurde Biotin verwendet, um zunächst unspezifisch alle Proteine an der Plasmamembran mit diesem Vitamin zu koppeln. Nach der Zellyse wurde folgend das gesamte p75-GFP (biotinyliert und nicht biotinyliert) aus dem Lysat immunpräzipitiert und danach die biotinylierte p75-GFP-Fraktion durch Neutravidinbeads isoliert. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls durch Autoradiographie detektiert und ausgewertet.

MDCK\_p75-GFP-Zellen wurden wie in der Oberflächen-IP auf Filtereinsätze ausgesät, mit siRNA transfiziert bzw. kontrollbehandelt und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin inkubiert. Statt eines TGN-Blocks wurde ein zweistündiger *chase* bei 37 °C durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf Eis transferiert und dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Der Sulfo-NHS-Biotin *crosslinker* (Thermo Fisher Scientific) wurde in PBS<sup>++</sup> gelöst und dann entweder apikal (0,5 mL) oder basolateral (1 mL) zu den Zellen pipettiert. Zu der Domäne ohne *crosslinker* wurde PBS<sup>++</sup> hinzugefügt. Die Zellen wurden 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und danach zunächst dreimal mit 0.1 M Glycin/PBS<sup>++</sup> und dann zweifach mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Das PBS<sup>++</sup> wurde gründlich abgesaugt und die Zellen auf den Filtern über Kopf für mindestens 1 h oder über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nun wurden die Zellen mit 0,5 mL 37 °C warmen Puffer 1 (-BSA) und 10 µL PI pro Filtereinsatz abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 4 °C über Kopf zur Zellyse wurde Zelldebris bei 17000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. 30 µL des Überstands wurden als Lysatprobe mit Laemmli-puffer versetzt und bei -20 °C eingefroren. Der restliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und ein *preclearing* mit PAS für 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler durchgeführt. Die *beads* wurden bei 1500 g für 2 min und 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Um das gesamte p75-GFP zu markieren, wurde das Lysat mit 1 µL GFP *fulllength* Antikörper (Clontech) für 1 h bei 4 °C über Kopf inkubiert. Danach wurden 50 µL PAS-*beads* hinzugegeben und der Ansatz über Nacht weiter inkubiert. Am selben Tag wurden noch die Neutravidinbeads vorbereitet, indem pro Filter 60 µL *beads* in 1 mL Puffer 1 (+BSA) über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Neutravidinbeads zweifach mit Puffer 1 (+BSA) gewaschen und dabei für 2 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und an den Rand des Reaktionsgefäßes je 2 µL PI und 10 µL 20 % BSA pipettiert. Die PAS-*beads* aus der IP wurden ebenso zentrifugiert und 40 µL 5 % SDS hinzugegeben. Um p75-GFP von den *beads* zu lösen, wurden sie bei 95 °C für 7 min in einem Heizblock schüttelnd inkubiert. Es wurden 460 µL P1 (-BSA) zum gekochten Ansatz hinzupipettiert und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf die vorbereiteten Neutravidinbeads transferiert. Diese wurden anschließend über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Am Folgetag wurden die *beads* bei 1500 g und 4 °C für 30 s sedimentiert und der Überstand mit intrazellulärem p75-GFP abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Nun wurden die *beads* mit Puffer 1 (+BSA) bis Puffer 4 (dreimal Puffer 4) gewaschen und danach 35 µL

Laemmli-Puffer hinzugegeben. Für die SDS-PAGE wurden die Proben bei 95 °C für 10 min aufgekocht und dann auf das 10%ige Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde wie bei der Oberflächen-IP fixiert und getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert. Daneben wurde mit den eingefrorenen Lysatproben eine SDS-PAGE mit Westernblot zur Überprüfung des Mx1-*knockdown* durchgeführt.

#### **Puffer 1 (pH 8,0)**

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
(BSA	0,2 % (w/v)*
*ergibt Puffer 1 +BSA	

#### **Puffer 2 (pH 8,0)**

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
BSA	0,2 % (w/v)

#### **Puffer 3 (pH 8,0)**

Tris	20 mM
NaCl	500 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)
BSA	0,2 % (w/v)

#### **Puffer 4 (pH 8,0)**

Tris	50 mM
------	-------

### **2.2.8 Sekretionsstudie**

Um einen Einfluss von Mx1 auf den Transport von sekretierten löslichen Proteinen ins extrazelluläre Milieu zu untersuchen, wurde eine Sekretionsstudie etabliert. Dazu wurden wie bei den beiden vorigen Transportstudien MDCK-Zellen auf Filtereinsätzen kultiviert und Mx1 durch RNA-Interferenz herunter reguliert. Danach wurden die ins Medium sekretierten Proteine über einen bestimmten Zeitraum gesammelt und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert, ob zwischen Zellen mit Mx1-*knockdown* und kontrollbehandelten Zellen Unterschiede existieren.

MDCK-Zellen wurden auf Filtereinsätzen in einer 6-*well* Platte ausgesät, mit siRNA gegen Mx1 transfiziert und bis zum Erreichen der Polarität kultiviert. Am Versuchstag wurden sie zunächst zweifach mit PBS gewaschen und dann für 1 h im Brutschrank mit je 700 µL MEM (ohne FKS und Phenolrot) apikal und basolateral inkubiert. 500 µL des Mediums wurde von beiden Membrandomänen abgenommen und mit 10 µL PI versetzt. Danach wurden die Proteine mit Amicon Zentrifugenfiltern (Merck Millipore) mit einem *cutoff* von 10 kDa für 45 min bei 17000 g und 4 °C eingengt und das Konzentrat mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Zellen wurden derweil doppelt mit PBS gewaschen und mit Standardlysepuffer lysiert. Die Lysatproben wurden zusammen mit den Mediumproben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Neben der Präsenz von gp80 und Galectin-3 im Medium bzw. Lysat, wurde auch die *knockdown*-Effizienz von Mx1 evaluiert.

## 2.3 Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden angewendet, deren Auswertung durch eine mikroskopische Analyse bewerkstelligt wurde. Im Folgenden werden zunächst die mikroskopischen Techniken bzw. Systeme kurz vorgestellt und im Anschluss die damit verknüpften Experimente beschrieben.

### 2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf den Grundlagen der Lichtmikroskopie und erlaubt die Betrachtung von zellulären Strukturen durch eine Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder durch die Kopplung an ein Fluoreszenzprotein. Das Präparat wird mit einer Quecksilberdampflampe bestrahlt, wobei ein Anregungsfilter nur Licht einer bestimmten Wellenlänge weiterleitet. Diese Wellenlänge entspricht idealerweise dem Exzitationsbereich des verwendeten Fluorophors, welches diese Lichtenergie absorbiert. Dabei werden seine Valenzelektronen für kurze Zeit in einen angeregten Zustand versetzt und beim Zurückfallen in den Ausgangszustand wird energieärmeres Licht einer höheren Wellenlänge (= Fluoreszenz) emittiert (siehe Abbildung 2.3). Das emittierte Licht wird durch einen Emissionsfilter vom Anregungslicht isoliert und mit einer *charge-coupled device* (CCD)-Kamera detektiert. Durch die Verwendung verschiedener Filtersätze in einem Mikroskop können unterschiedliche Fluorophore separat angeregt und betrachtet werden. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird das ganze Präparat vom Anregungslicht beleuchtet, wodurch emittiertes Licht von Fluorophoren außerhalb der scharf eingestellten optischen Ebene zu einem Schärfeverlust führen kann. In dieser Arbeit wurde das inverse Epifluoreszenzmikroskop DMI 6000 B von Leica Microsystems mit der Steuerungs- und Bildbearbeitungssoftware LAS AF verwendet.

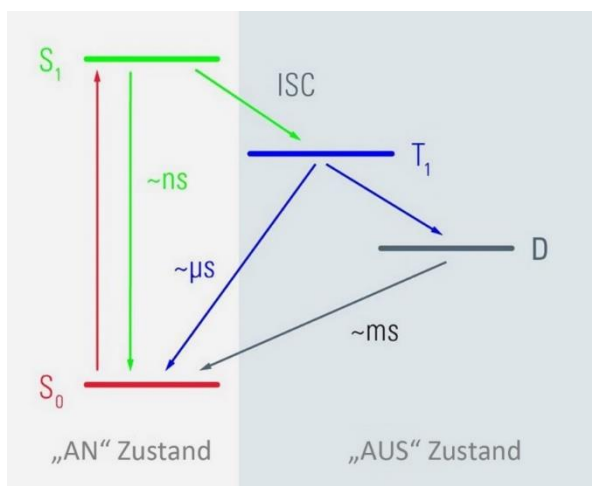


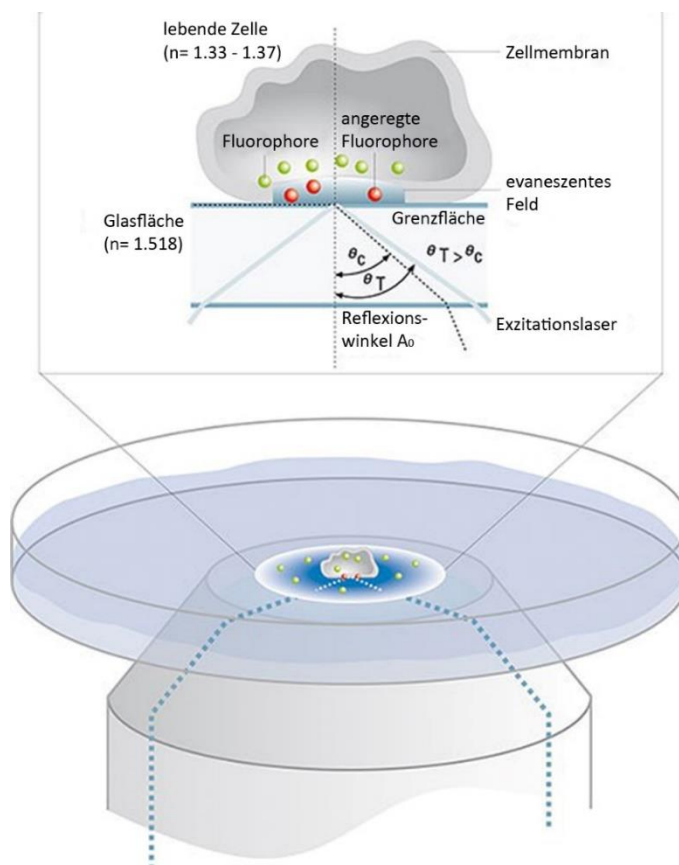
Abbildung 2.3: Jablonski Diagramm

Durch die Absorption von Energie in Form von aufgenommenen Photonen werden Valenzelektronen eines Fluorophors vom Grundzustand ( $S_0$ ) in einen energetisch höheren Zustand ( $S_1$ ) versetzt. Dieser Zustand ist sehr kurzlebig und die Elektronen fallen wieder zurück in den Grundzustand. Dabei wird Fluoreszenzlicht emittiert. Durch ISC (*intersystem crossing*) können die Elektronen auch einen Triplettzustand ( $T_1$ ) erreichen. Gehen sie von dort zurück in den  $S_0$ -Zustand, entsteht Phosphoreszenz. Unter Aufwendung hoher Energie können sie auch in den Dunkelzustand (D) versetzt werden. Dieser Zustand ist längerlebig als  $S_1$  oder  $T_1$  und Fluorophore können hier kein Licht emittieren (modifiziert nach Lampe, 2012).

### 2.3.2 Total Internal Reflection Fluorescence-Mikroskopie

Die *Total Internal Reflection Fluorescence-Mikroskopie* (TIRFM) ist eine besondere Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie, mit der es möglich ist ein Präparat nur bis zu einer geringen Tiefe (bis 300 nm) anzuregen und somit Streulicht anderer Ebenen zu eliminieren. Dies wird durch das optische Phänomen der Totalreflexion erreicht, bei der ein, an einer Glas-Wasser-Grenzschicht flach eintretender, Lichtstrahl komplett reflektiert wird. Hinter der Glasschicht entsteht ein evaneszentes Feld mit geringer Penetrationstiefe, in welchem die darin liegenden Fluorophore angeregt werden. In der Zellbiologie erlaubt die TIRFM so die Beobachtung von Strukturen unmittelbar an der Plasmamembran, wenn Zellen auf Glasbodengefäßen kultiviert werden. Der Aufbau des TIRF-Mikroskops basiert auf einem klassischen Fluoreszenzmikroskop, wobei als Lichtquelle im TIRF-Modus Laser mit definierter Wellenlänge verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die apikale Domäne von polaren MDCK-Zellen mittels TIRFM untersucht.

Dazu wurden die Zellen zunächst auf Filtereinsätzen kultiviert. Zur Mikroskopie wurden die Filtermembranen mit einem Skalpell aus den Einsätzen herausgetrennt und mit den Zellen über Kopf auf ein mit PBS gefülltes Glasbodengefäß gelegt. Dadurch konnten spezifisch Fluorophore an der apikalen Membran im evaneszenten Feld illuminiert werden. Zur TIRFM wurde ein DMI 6000 B mit TIRF-Modul von Leica Microsystems und ein HCX PL APO Objektiv mit 100-facher Vergrößerung verwendet. Als Steuerungs- und Bearbeitungssoftware diente LAS AF Version 3.0 von Leica Microsystems.



**Abbildung 2.4: Funktionsprinzip der TIRFM**

Wenn Licht aus einem Medium mit hohem Brechungsindex (z. B. Glas) auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex (z. B. Wasser/Zellen) trifft, kann es total reflektiert werden. Dazu muss der Exzitationslaser im sogenannten kritischen Winkel ( $\theta_c$ ) auf das Präparat treffen. Es entsteht ein evaneszentes Feld mit geringer Penetrationstiefe, in dem darin liegende Fluorophore angeregt werden. (modifiziert nach Ockenga, 2012).

### 2.3.3 *Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*

Die Auflösungsgrenze eines herkömmlichen Licht- oder Fluoreszenzmikroskops wird durch das Abbe-Limit beschrieben. Durch die auftretende Beugung in der Optik des Mikroskops müssen 2 Fluorophore mindestens 200 nm voneinander getrennt liegen, um sie als zwei separate Punkte wahrnehmen zu können. Neuere Mikroskopietechniken, wie die *Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return* (GSDIM), umgehen die Auflösungsgrenze durch die separate Betrachtung einzelner Fluorophore (Bretschneider *et al.*, 2007). Dies wird dadurch erreicht, dass Fluorophore neben dem Ausgangs- und Anregungszustand unter Aufwendung hoher Lichtenergie auch in einen dritten Zustand, den sogenannten Dunkelzustand versetzt werden können (siehe Abbildung 2.3). In diesem Zustand emittieren sie kein Licht, können aber spontan in den Ausgangszustand zurückkehren, angeregt werden und nachfolgend fluoreszieren. Der Großteil der Fluorophore verbleibt jedoch im Dunkelzustand, sodass immer nur einzelne Fluorophore Licht aussenden. Über einen langen Zeitraum werden Einzelbilder der sogenannten „Blinkereignisse“ aufgenommen und am Ende zu einem Gesamtbild kombiniert. Durch diese Technik können Auflösungen von ca. 20 nm erreicht werden, sodass man bei GSDIM auch von hochauflösender Mikroskopie spricht.

Damit das Blinken der Fluorophore möglich ist, muss das Präparat frei von Sauerstoff sein. Dazu wurden die Proben bei der Mikroskopie in 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA), einem reduzierenden Agens, in PBS eingebettet. Die Analyse erfolgte mit einem Leica SR GSD Modul auf einem DMI 6000 B TIRF Setup (Leica Microsystems) mit einem 100-fach Immersionsobjektiv. Die hochauflösende Mikroskopie konnte so mit apikaler TIRFM kombiniert werden, wodurch die detaillierte Betrachtung der apikalen Domäne polarer MDCK-Zellen möglich war. Zur Anregung wurde ein Laser mit starker Intensität bei 642 nm verwendet. Die Mikroskopie und Bildanalyse erfolgte mit der Software LAS AF Version 3.0 von Leica Microsystems.

### 2.3.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM) bedient sich eines anderen optischen Aufbaus als Techniken die auf Epifluoreszenz basieren. Zwischen der Anregungslichtquelle und dem Präparat befindet sich eine Lochblende, die das Exzitationslicht punktgenau auf eine Stelle im Präparat fokussiert. Eine zweite Lochblende befindet sich zwischen dem Präparat und dem Detektor, welche Streulicht aus dem Präparat ausblendet und nur Licht der Fokusebene passieren lässt. Wenn beide Lochblenden auf denselben Fokuspunkt eingestellt sind, so sind sie konfokal. Auf diese Weise ist es möglich das Präparat nur in einem kleinen Punkt in der Fokusebene zu beleuchten und nur dort die Fluorophore anzuregen. Durch das zeilenweise Abrastern des Präparats setzt sich das Bild am PC zusammen. Dies ermöglicht schärfere Aufnahmen im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. Als Detektor kommt im KLSM keine Kamera zum Einsatz, sondern ein sogenannter Photoelektronenvervielfacher, in welchem die auftreffenden Photonen durch eine Sekundärelektronenreaktionskette verstärkt werden. Als Lichtquelle dienen Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, um verschiedene Fluorophore anregen zu können. Wenn mehrere fluoreszierende Moleküle mit verschiedenen Anregungsspektren im selben



Präparat vorliegen, kann es vorkommen, dass sich die Anregungsspektren überschneiden und diese Fluorophore gleichzeitig mit derselben Wellenlänge angeregt werden. Um diesen *crosstalk* zu verhindern, wurden die Präparate sequenziell abgerastert. Für diese Arbeit wurde das TCS SP2 (Leica Microsystems) mit einem HCX PL APO CS 40-fach Immersionsobjektiv verwendet. Zur Aufnahme wurde die Leica *Confocal* Software Version 2.61 und zur Bildbearbeitung LAS AF 2.7 eingesetzt.

**Tabelle 2.5: Verwendete Fluorophore und ihr Exzitations- und Emissionsspektrum**

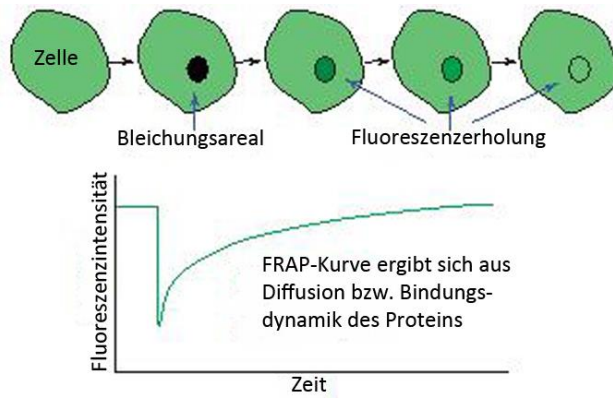
Fluorophor	Wellenlänge des Exzitationslasers [nm]	Wellenlänge des Emissionsspektrums [nm]
DAPI	405	410-470
GFP, Alexa Fluor 488	488	495-535
YFP	514	520-540
DsRed, Alexa Fluor 546	543	565-620
Alexa Fluor 647	633	640-700

### 2.3.5 Lebendzellmikroskopie

Bei der Lebendzellmikroskopie werden Beobachtungen an vitalen Zellen durchgeführt. Sie erfordert daher keine aufwendige Anfertigung von mikroskopischen Präparaten wie z.B. bei der Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden vorab auf Deckgläschen oder Filtereinsätzen ausgesät und mit fluoreszierenden Fusionsproteinen transfiziert oder Lebendfarbstoffen behandelt. Zur Mikroskopie wurden sie in eine Bachoferkammer überführt, welche mit PBS oder 25 mM HEPES-gepufferten Medium ohne pH-Indikator gefüllt war. Die Kammer mit Puffer bzw. Medium wurde mit Hilfe einer Heizeinheit auf 37 °C vorgeheizt und die Mikroskopie wurde ebenfalls bei dieser Temperatur durchgeführt. Über einen definierten Zeitraum wurden regelmäßig Bilder aufgenommen, die zusammengefügt eine Filmsequenz der mikroskopierten zellulären Vorgänge ergeben. Für die Lebendzellbeobachtung wurden sowohl das Fluoreszenzmikroskop DMI6000 B oder das TCS SP2 Konfokalmikroskop verwendet.

### 2.3.6 *Fluorescence Recovery after Photobleaching*

*Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) stellt eine besondere Weiterentwicklung der Lebendzellmikroskopie dar. Mit dieser Methode lassen sich dynamische Prozesse in lebenden Zellen analysieren und quantifizieren (Axelrod *et al.*, 1976). Dazu werden ebenfalls zunächst fluoreszierende Fusionsproteine exprimiert und die vitalen Zellen am Mikroskop betrachtet. Mit hoher Laserenergie wird nun ein bestimmtes Areal in der Zelle gebleicht und nachfolgend der Wiedereintritt fluoreszierender Moleküle in die gebleichte Region aufgenommen und gemessen (siehe Abbildung 2.5). So lassen sich Rückschlüsse auf die Kinetik des untersuchten Proteins ziehen, ob es z. B. frei im Zytoplasma diffundiert oder aktiv mit Hilfe weiterer Proteine transportiert wird.

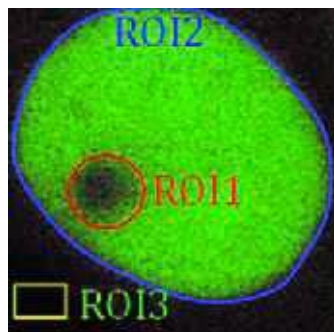


**Abbildung 2.5: Prinzip eines FRAP-Experiments**

Mit hoher Laserintensität wird ein Areal in der Zelle gebleicht und nachfolgend der Eintritt fluoreszierender Moleküle in dieses Areal gemessen. Die Fluoreszenzintensität wird im Anschluss über die Zeit quantifiziert (modifiziert nach Sprague und McNally, 2005).

Für die FRAP-Analyse dieser Arbeit wurden COS-7-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit Mx1-GFP transfiziert. Zur Mikroskopie am TCS SP2 wurden die Deckgläschen in eine mit PBS gefüllte Bachoferkammer transferiert, welche konstant auf 37 °C gehalten wurde. Nun wurde in der Zelle eine Region ausgewählt, die sowohl Mx1-positive Vesikel als auch einen zytosolischen Bereich beinhaltete. Die Bildaufnahmerate wurde auf 0,453 s mit (Scangeschwindigkeit 1400 Hz) eingestellt und zunächst 20 Bilder aufgenommen, um die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichvorgang zu bestimmen. Nun wurden mit höchster Laserenergie mit den Wellenlängen 405, 458, 476 und 488 nm die Fluorophore des Areals ausgebleicht. Hiernach wurde nur mit geringer Exzitationsenergie bei 488 nm angeregt und der Wiedereintritt von Mx1-GFP in das Areal für mehrere Minuten gemessen.

Die Quantifizierung wurde mit LAS AF 2.7 und Microsoft Excel 2013 durchgeführt. Zunächst wurden in der aufgenommenen Bildfolge drei Regionen von Interesse (ROI) bestimmt, die das gebleichte Areal (ROI1), die gesamte Zelle (ROI2) und eine Region außerhalb der Zelle (ROI3) umfassen (siehe Abbildung 2.6). Die Daten wurden zunächst gegen die Fluoreszenzintensität in ROI1 vor dem Bleichen und einen möglichen Intensitätsverlust der gesamten Zelle während der Erholungsphase doppelt normalisiert (2.2; Goodwin und Kenworthy, 2005). Die Hintergrundfluoreszenz (ROI3) wurde zuvor von allen Messwerten subtrahiert (2.1).



**Abbildung 2.6: ROI-Auswahl zur Quantifizierung eines FRAP-Experiments**

Für eine exakte Auswertung eines FRAP-Experiments müssen drei Regionen von Interesse (ROIs) erstellt werden. ROI1 umfasst das gebleichte Areal, ROI2 misst die Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle und im ROI3 wird die Hintergrundfluoreszenz detektiert (Rapsomaniki *et al.*, 2012).

$$\begin{aligned}
 I(t)_{ROI1'} &= I(t)_{ROI1} - I(t)_{ROI3} \\
 I(t)_{ROI2'} &= I(t)_{ROI2} - I(t)_{ROI3}
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

$$I(t)_{norm}^{double} = \left( \frac{\frac{1}{n_{pre}} \cdot \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_{ROI 2'}}{I(t)_{ROI 2'}} \right) \cdot \left( \frac{I(t)_{ROI 1'}}{\frac{1}{n_{pre}} \cdot \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_{ROI 1'}} \right) \quad (2.2)$$

Nachfolgend wurde eine *fullscale*-Normalisierung angeschlossen, durch welche die Fluoreszenzintensität nach dem Bleichvorgang für alle Datensätze auf das gleiche Niveau angepasst wurde (2.3; Ellenberg *et al.*, 1997).

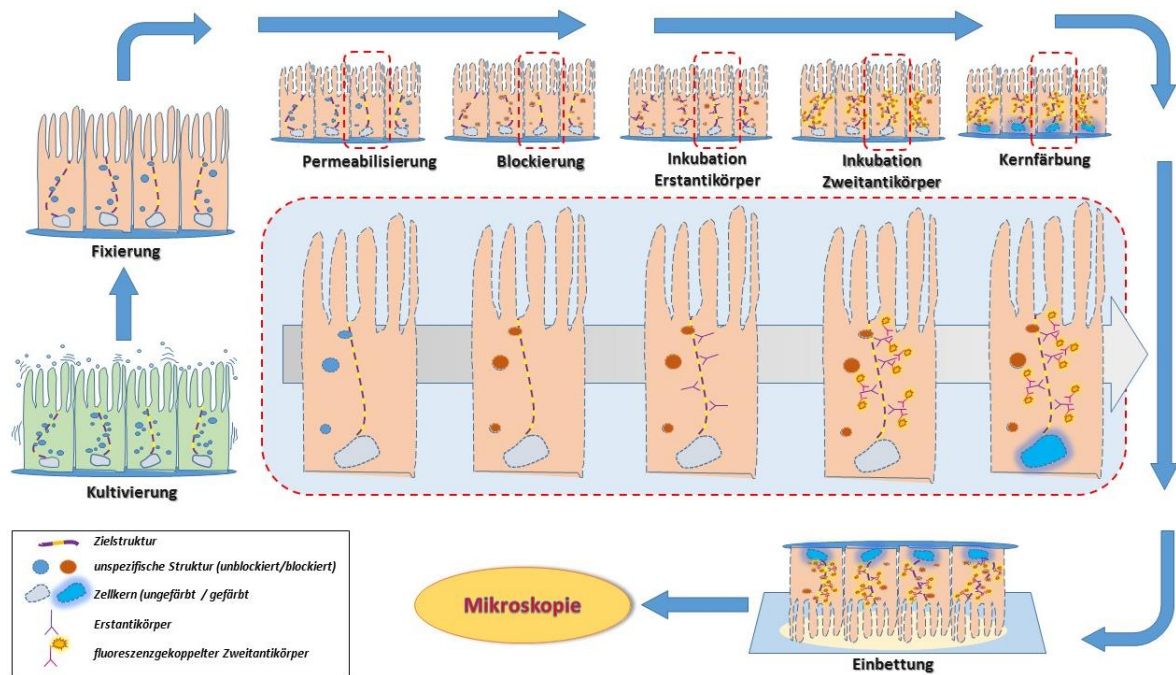
$$I(t)_{norm}^{fullscale} = \frac{I(t)_{norm}^{double} - I(t_{postbleach})_{norm}^{double}}{1 - I(t_{postbleach})_{norm}^{double}} \quad (2.3)$$

Mit Hilfe von GraphPad Prism wurde mit den Daten eine Ausgleichsrechnung unter Beachtung einer einfachen oder einer doppelten Bindungsfunktion durchgeführt (Sprague und McNally, 2005).

### 2.3.7 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF) können Proteine in fixierten Zellen immunologisch visualisiert werden. Die Auswahl verschiedener Antikörper und Fluorophore ermöglicht eine sehr flexible Gestaltung der IF-Experimente im Gegensatz zur Expression von Fluoreszenzproteinen. Ebenfalls wird durch die IF das Risiko von Artefakten durch die Überexpression von Fusionsproteinen umgangen. In dieser Arbeit wurde eine Zweischnitt-Antikörperdetektion (= indirekte IF) ausgeführt, bei welcher zunächst der Erstantikörper an das Protein von Interesse bindet. Ein fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper erkennt im Anschluss die Fc-Region des Erstantikörpers und macht den Immunkomplex somit im Mikroskop sichtbar.

Die Zellen wurden vorab auf Deckgläschen oder Filtereinsätzen kultiviert und am gewünschten Tag fixiert. Dazu wurden sie zunächst in eine feuchte Kammer transferiert, doppelt mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit 4 % PFA für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und die Zellmembran mit einem Detergens permeabilisiert. MDCK-Zellen wurden dafür mit 0,1 % Triton X-100/PBS und COS-7-Zellen mit 0,025 % Saponin/PBS für 20 min bei RT inkubiert. Es erfolgte ein Waschschnitt wie zuvor und die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch die Inkubation mit 1 % BSA/PBS oder 5 % Ziegen Serum/PBS für 1 h bei RT. Die Blockierlösung wurde abgesaugt und der Erstantikörper, ebenfalls verdünnt in Blockierlösung, für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf die Zellen pipettiert. Hiernach wurde viermal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und die Inkubation mit dem Zweitantikörper, verdünnt in PBS, für 1 h bei RT angeschlossen. Die Antikörperlösung wurde abgesaugt und eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 1:2000 in PBS für 10 min durchgeführt. Es wurde erneut viermal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und die Zellen mit Mowiol eingedeckelt.



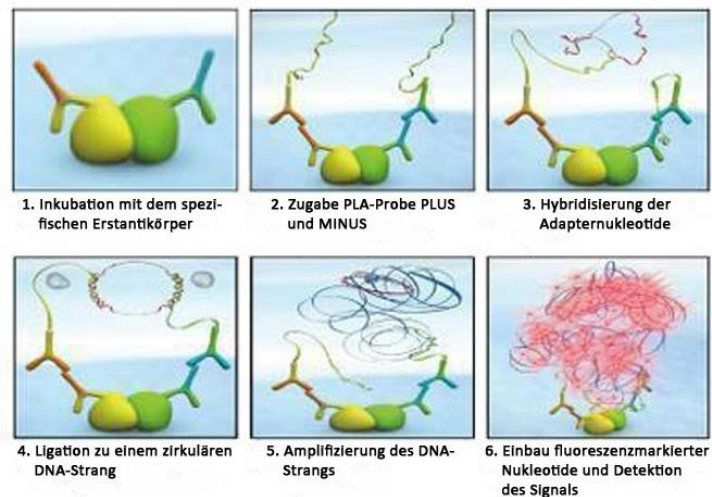
**Abbildung 2.7: Ablauf einer Immunfluoreszenz in polaren Epithelzellen**

Die Zellen werden zunächst auf Deckgläschen kultiviert und im Anschluss fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran findet die Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper statt. Dieser bindet an die gewünschte Zielstruktur. Danach wird ein fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper appliziert, welcher den Erstantikörper erkennt. Mit einem DNA-Farbstoff werden die Zellkerne markiert und die Zellen im Anschluss eingebettet. Nach Aushärtung des Einbettmediums kann das Präparat im Mikroskop betrachtet werden (Hoff, 2015).

Nach Aushärtung der Präparate wurden diese mit dem TCS SP2 betrachtet. Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers wurden für jede Färbung Proben angefertigt, die nur mit dem entsprechenden Zweitantikörper behandelt wurden. Mit diesen Proben wurde der Schwellenwert für die Aufnahmeeinstellungen des Konfokalmikroskops festgelegt.

### 2.3.8 Proximity Ligation Assay

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) basiert wie die IF auf einer immunologischen intrazellulären Detektion von Proteinen. Allerdings werden bei dieser Methode nicht die Proteine selbst sichtbar, sondern nur die Orte an denen zwei Proteine in nächster Nähe zueinander vorliegen. Der PLA ist daher hervorragend geeignet, um Kollokalisationsstudien aus der IF oder biochemisch nachgewiesene Proteininteraktionen zu unterstützen. Ähnlich wie bei der IF werden die fixierten Zellen mit zwei Erstantikörpern gegen die beiden gewünschten Zielproteine inkubiert. Die verwendeten Zweitantikörper sind nicht an ein Fluorophor gekoppelt, sondern tragen kurze Oligonukleotide. Wenn beide Proteine sehr nah beisammen liegen (bis 40 nm), können die gebundenen Oligonukleotide nach Zugabe von Adapternukleotiden und einer Ligase zu einem zirkulären DNA-Strang komplettiert werden. In einer weiteren Reaktion wird mit einer DNA-Polymerase der DNA-Strang amplifiziert (*rolling circle amplification*). Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet, sodass im Mikroskop dort wo beide Proteine in räumliche Nähe treten ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist.



**Abbildung 2.8:** Ablauf des *Proximity Ligation Assays*

Um festzustellen, ob zwei Proteine in nächster Nähe zueinander vorliegen, werden diese zuerst mit spezifischen Erstantikörpern markiert. Danach erfolgt die Zugabe der Zweitantikörper mit den gekoppelten Oligonukleotiden. Die Nukleotidstränge werden mit Adapternukleotiden verlängert und anschließend durch eine Ligase zu einem zirkulären DNA-Strang verknüpft. Dieser Strang wird mit einer Polymerase amplifiziert, wobei fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut werden und somit PLA-Signale im Mikroskop sichtbar werden (Abnova).

Der PLA wurde mit dem *Duolink In Situ PLA-Kit* (Olink Bioscience) durchgeführt. Die Zellen wurden dazu wie in der IF vorab kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen und die Inkubation mit den beiden Erstantikörpern wurden ebenfalls wie in der IF beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde zum Blocken die Blockierlösung des Kits verwendet und auch die Antikörper in einer separaten mitgelieferten Lösung verdünnt. Zwischen beiden Schritten wurde dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch das zweimalige Waschen mit PBS<sup>++</sup> für 5 min entfernt. Danach wurden die Oligonukleotid-konjugierten Zweitantikörper (1:5 in der Antikörperverdünnungslösung) auf die Zellen pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Folgend wurde zweimal für je 5 min mit Waschpuffer A gewaschen und hiernach die Ligation angeschlossen. Der Ligationspuffer wurde zunächst 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und zu dieser Verdünnung die Ligase im Verhältnis 1:40 hinzugefügt. Die beiden Nukleotidstränge wurden für 1 h bei 37 °C ligiert und danach zweifach je 2 min mit Waschpuffer A gewaschen. Für die Polymerasereaktion wurde der Amplifikationspuffer 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und darin die DNA-Polymerase im Verhältnis 1:80 hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf die Zellen gegeben und für 100 min bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurde je 10 min zweimal mit 1x Waschpuffer B und einmal mit 0,01x Waschpuffer B gewaschen. Zur Mikroskopie wurden die Zellen im Einbettmedium des Kits aufgenommen, welches gleichzeitig einen DNA-Farbstoff zur Kernfärbung enthält.

### 2.3.9 SNAP-tag

Durch den SNAP-tag ist es möglich zwischen verschiedenen Populationen eines Proteins in der Zelle unterscheiden zu können. So können alle bereits vorhandenen Moleküle des Proteins maskiert und alle nachfolgend synthetisierten Moleküle durch die Kopplung eines Fluorophors visualisiert werden. Dazu wird der SNAP-tag an das gewünschte Protein kloniert und das Fusionsprotein in die Zelle transfiziert. Nach der Zugabe des membranpermeablen Bromothenylpteridine (BTP) als Blocks substrat ohne Fluoreszenz werden alle bereits exprimierten SNAP-Proteine irreversibel für weitere Markierungsreaktionen blockiert. Die Bindung des Substrats durch den SNAP-tag wird durch ein Derivat der O-6-Alkylguaninalkyltransferase (hAGT) realisiert, welche die hinzugefügten Benzylguaninsubstrate mit oder ohne gekoppeltem Fluorophor erkennt und kovalent mit dem Fusionsprotein verknüpft. In dieser Arbeit wurde ein p75<sup>NTR</sup> SNAP-tag Fusionsprotein (p75SNAP) verwendet (Straube *et al.*, 2013), um nachzuweisen, dass neu synthetisiertes p75<sup>NTR</sup> bei 20 °C im Trans-Golgi-Netzwerk akkumuliert werden kann und nachfolgend p75<sup>NTR</sup> im exozytotischen Transportweg mit Mx1 kolokalisiert. Dazu wurden MDCK-Zellen vorab mit p75SNAP und dem Golgi-Marker Galaktosyltransferase (GT)-DsRed transfiziert und bis zum Erreichen ihrer Polarität auf Deckgläsern kultiviert. Vorhandenes p75SNAP wurde durch die Inkubation mit SNAP-Cell block (NEB) für 20 min bei 37 °C maskiert. Überschüssiges Blocks substrat wurde durch Waschen entfernt und die Zellen für einen TGN-Block auf 20 °C für 12 h transferiert. Während den letzten zwei Stunden wurde Oregon Green als Färbesubstrat hinzugegeben und ein TGN-Exit bei 37 °C für verschiedene Zeitpunkte angeschlossen. Die Zellen wurden nachfolgend fixiert und Mx1 mittels IF detektiert. Die Zellen wurden eingedeckelt und im TCS SP2 betrachtet.

### 2.3.10 Internalisierung von rekombinantem Galectin-3

Durch ein Internalisierungsexperiment von rekombinantem Galectin-3 ist es möglich das Lektin gezielt im endosomalen Recyclingweg zu betrachten. Dazu wurde rekombinantes humanes Galectin-3 aus *E. coli* aufgereingt, mit Alexa Fluor 647 (A647) fluoreszenzmarkiert (Schneider *et al.*, 2010) und zur Internalisierung auf die apikale Domäne polarer MDCK-Zellen pipettiert.

Im Detail wurden polare MDCK-Zellen auf Filtereinsätzen zweimal für je 30 min in MEM (ohne FKS und PSG) bei 37 °C inkubiert und dann zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1,5 µM rekombinantes Galectin-3-A647 in PBS<sup>++</sup> apikal auf die Zellen gegeben und zur Bindung an die Zellmembran für 30 min bei 4 °C inkubiert. Basolateral wurde MEM (ohne FKS und PSG) hinzugefügt. Die Zellen wurden nun für 30 min auf 37 °C transferiert, um die Endozytose des rekombinanten Proteins zu erlauben. Nachfolgend wurde dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, die Zellen fixiert und eine IF gegen Mx1 angeschlossen. Die fertigen Präparate wurden mit Hilfe des TCS SP2 analysiert.

### 2.3.11 Immunfluoreszenz von histologischen Präparaten

Die Mx1-Expression wurde ebenfalls in histologischen Präparaten der humanen Niere durch die Detektion per Immunfärbung untersucht. Hierzu wurden die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte vorab in Rotihistol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert und einmal mit dH<sub>2</sub>O und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Erstantikörper, verdünnt in *Antibody Diluent* (Dako) über Nacht bei 4 °C appliziert. Freie, unspezifische Bindungsstellen wurden durch das *Antibody Diluent* gleichzeitig blockiert. Es wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper, ebenso in *Antibody Diluent* verdünnt, inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (1:2000 in PBS) für 5 min bei RT gefärbt, die Präparate zweimal mit PBS, einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Die Analyse wurde mit dem TCS SP2 durchgeführt.

## 2.4 Auswertung und Statistik

### 2.4.1 Quantifizierung biochemischer Experimente

Westernblots und die durch Autoradiographie analysierten Gele wurden mit Hilfe der Software *LabImage 1D* (Kapelan Bio-Imaging) densitometrisch quantifiziert. Die Normalisierung gegen Ladekontrollen oder Lysatproben wurde mit Hilfe von Microsoft Excel durchgeführt.

### 2.4.2 Quantifizierung mikroskopischer Experimente

Die Kolokalisierungsanalysen in den Studien zur Antikörperspezifität (Abbildungen 3.1, 3.2 und 5.1) wurden mit Hilfe der Software LAS AF 3.2 realisiert. Der Schwellenwert beider Kanäle wurde auf 15 % eingestellt. Die Kolokalisierungen der IF-Studien wurden mit Volocity Version 5 (Perkin Elmer) ausgewertet. Bei MDCK-Zellen wurden dazu 30 x 30 µm Bildausschnitte und für COS-7-Zellen einzelne Zellen analysiert. Der Manders Kolokalisierungskoeffizient wurde benutzt um kolokalisierte Vesikel quantitativ zu bestimmen. Vesikuläre Proteine galten als kolokalisiert, wenn  $Mx$  und  $My \geq 0.5$ . Die Normalisierung gegen die Gesamtzahl einer bestimmten Vesikelpopulation wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. PLA-Signale wurden ebenfalls mit Volocity quantifiziert und die Gesamtzahl der PLA-Ereignisse gegen die ausgewertete Fläche in Microsoft Excel normalisiert.

### 2.4.3 Statistik

Die Daten aus den biochemischen oder mikroskopischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) zusammengefasst und graphisch aufbereitet. Dazu wurden, wenn nicht anders angegeben, Daten aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ausgewählt. In allen Abbildungen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung abgebildet. Eine mögliche statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten t-Test evaluiert.

Tabelle 2.6: Verwendete Erstantikörper mit eingesetzter Verdünnung in den verschiedenen Anwendungen

Erstantikörper	Spezies	mk/pk	Hersteller	Verdünnung			
				WB	IF	PLA	Histo
<b>Aktin Ab5</b>	Ma	mk	BD Bioscience	1:4000		1:100	
<b>Alix (H-270)</b>	Ka	pk	Santa Cruz		1:50		
<b>CD29</b>	Ma	mk	BD Bioscience	1:400			
<b>CEACAM1</b>	Ma	mk	Sino Biological				1:100
<b>Dynamin-2 (B-2)</b>	Ma	mk	Santa Cruz	1:100		1:100	
<b>Dynein IC</b>	Ma	mk	Novus Biol.		1:100	1:100	
<b>E-Cadherin</b>	Ma	mk	BD Bioscience				1:100
<b>EEA1</b>	Ma	mk	BD Bioscience		1:200		
<b>Galectin-3 H-160</b>	Ka	Pk	Santa Cruz	1:500	1:50	1:50	
<b>Galectin-3 M3/38</b>	Ra	mk	Santa Cruz				1:100
<b>GAPDH (1D4)</b>	Ma	mk	Enzo	1:500			
<b>GFP full length</b>	Ka	pk	Clontech	1:1000		1:500	
<b>GFP JL-8</b>	Ma	mk	Clontech	1:5000		1:1000	
<b>gp135</b>	Ma	mk	R. Kroschweski	1:1000			
<b>gp80</b>	Zi	pk	Santa Cruz	1:1000			
<b>hnRNP A2B1</b>	Ka	pk	Santa Cruz			1:50	
<b>Kif5</b>	Ka	pk	Acris			1:50	
<b>Kinesin 5C</b>	Ka	pk	Acris		1:100		
<b>Kinesin HC</b>	Ma	mk	USBiological		1:100	1:100	
<b>Lamin A/C</b>	Ka	pk	Santa-Cruz			1:50	
<b>LAMP-1</b>	Ka	pk	Abcam		1:100		
<b>Mx1 2G12</b>	Ma	mk	Origene	1:2000	1:200	1:200	1:100
<b>Mx1 M143</b>	Ma	mk	G. Kochs	1:1000	1:200	1:200	
<b>Mx1 pAb</b>	Ka	pk	Protein Tech	1:400	1:200	1:200	1:200
<b>Rab11</b>	Ma	mk	BD Bioscience		1:100	1:100	
<b>Rab25 (H-51)</b>	Ka	pk	Santa Cruz		1:50		
<b>Rab4</b>	Ma	mk	BD Bioscience		1:100	1:100	
<b>Rab8</b>	Ma	mk	BD Bioscience		1:100	1:100	
<b>Villin</b>	Ka	rb	D. Delacour				1:200
<b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	Ma	mk	Sigma-Aldrich	1:4000	1:200	1:200	
<b><math>\beta</math>-Catenin</b>	Ma	mk	Sigma-Aldrich			1:200	

mk: monoklonal, pk: polyklonal, WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz, PLA: *Proximity Ligation Assay*, Histo: Histologie, Ma: Maus, Ka: Kaninchen, Zi: Ziege Ra: Ratte.



Tabelle 2.7: Verwendete Zweitantikörper mit eingesetzter Verdünnung in den verschiedenen Anwendungen

Zweitantikörper	Spezies	mk/pk	Hersteller	Verdünnung			
				WB	IF	PLA	Histo
Anti Kaninchen-Alexa Fluor 488	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Kaninchen-Alexa Fluor 546	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Kaninchen-Alexa Fluor 647	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Kaninchen-HRP	Zi	pk	BioRad	1:2000			
Anti Kaninchen-PLUS	Es		Olink Bioscience			1:5	
Anti Maus-Alexa Fluor 488	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Maus-Alexa Fluor 546	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Maus-Alexa Fluor 647	Zi	pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Maus-HRP	Zi	pk	BioRad	1:2000			
Anti Maus-MINUS	Es		Olink Bioscience			1:5	
Anti Ratte-Alexa Fluor 546		pk	Thermo Fisher Scientific		1:200		1:400
Anti Ziege-HRP	Es	pk	Santa Cruz	1:2000			
Phalloidin-Alexa Fluor 546			Thermo Fisher Scientific		1:40		

mk: monoklonal, pk: polyklonal, WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz, PLA: *Proximity Ligation Assay*, Histo: Histologie, Zi: Ziege, Es: Esel.

Tabelle 2.8: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle

Chemikalie	Hersteller / Bezugsquelle
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Chloroquin	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Amersham, Piscataway (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biowest, Nuaille (Frankreich)
Geneticin (G418)	Merck Millipore, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin (10x)	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
Mowiol 4-88	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
NeutrAvidin	Pierce, Rockwell (USA)
Nonidet P-40 (NP-40)	Merck Millipore, Darmstadt
PageRuler SDS-PAGE Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Protein-A-Sepharose (PAS)	Amersham, Piscataway (USA)
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration</i> ECL Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ziegenserum	Dako, Hamburg
$\beta$ -Mercaptoethylamine (MEA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Allgemein gebräuchliche, nicht aufgeführte Reagenzien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Sigma, Roth, ICN, Merck, Serva, Fluka oder von Riedel-de Häen bezogen.

Tabelle 2.9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquelle

Gerät / Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
<b>Zellkultur</b>	
Brutschrank Typ B6	Heraeus, Hanau
Cryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster
Cryosystem 6000 Stickstofftank	MVE / Chart Biomedical, Garfield Heights (USA)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Filtereinsätze für die Zellkultur	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
Forma Series II Zellkulturinkubator (CO <sub>2</sub> -begast) mit Wasserkühlung	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Galaxy B Zellkulturinkubator (CO <sub>2</sub> -begast)	RS Biotech, Irvine (UK)
HeraCell 150i Zellkulturinkubator (CO <sub>2</sub> -begast)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
HeraSafe Sterilbank für die Zellkultur	Kendro, Langenselbold
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Multi Temp III Wasserkühlung für Zellkulturinkubator	Amersham, Piscataway (USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
WOB-L Absaugpumpe 2511	Welch, Niles (USA)
Zellkulturplatten	WillCo, Amsterdam (Niederlande) und Sarstedt, Nürnbrecht
<b>SDS-PAGE und Westernblot</b>	
Elektrophoresekammer Mighty Small II	Hoefer, San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer miniVE	Hoefer, San Francisco (USA)
Gießvorrichtung	Hoefer, San Francisco (USA)
Glasplatten, <i>spacer</i> , Kämme	Hoefer, San Francisco (USA)
Netzgerät EPS 301	Amersham, Piscataway (USA)
Netzgerät EPS 501	Amersham, Piscataway (USA)
Netzgerät PowerPac Basic	BioRad, Hercules (USA)
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Transblot Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, Hercules (USA)
<b>Zentrifugen</b>	
Kühlzentrifuge BioFuge fresco	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tischzentrifuge BioFuge pico	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Rotofix 32A	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

Heizblöcke und Schüttler	
Heizblock MB-102	Bioer, Hangzhou (China)
Heizblock UBD	Grant Instruments, Cambridge (UK)
Heizrührer Yellow Line MSH basic	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttler DOS-10L	NeoLab, Heidelberg
Schüttler Rocker 25	Labnet International, Edison (USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Mikroskope	
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP2 auf Stativ DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Epifluoreszenzmikroskop DMI6000 B mit AM TIRF MC Modul	Leica Microsystems, Wetzlar
SR GSD auf DMI6000 B mit AM TIRF MC Modul	Leica Microsystems, Wetzlar
Kontrollgerät <i>Tempcontrol 37-2 digital</i> (für Mikroskop DMI6000 B)	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Optische Analysegeräte	
ECL Chemocam Imager	Intas, Göttingen
Tecan infinite M200	Tecan, Männerdorf (Schweiz)
Radioluminografie-Scanner FLA-3000	Fujifilm, Minato (Japan)
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sonstige Geräte	
CyberScan ph 510	Eutech Instruments, Nijkerk (Niederlande)
Analysewaage SBC 22	ScalTec Instrumentents, Göttingen
Präzisionswaage SI-114	Denver Instruments, Göttingen
BAS Kassette 2025	Fujifilm, Minato (Japan)
<i>storage phosphor screen</i>	Amersham, Piscataway (USA)
Membran-Vakuumpumpe Typ N86 KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Reinstwassersystem Elix UV	Millipore, Billerica (USA)
Absaugsystem Vacusafe	Integra Bioscience, Biebertal
Sonstiges Verbrauchsmaterial	
Deckgläser (42 mm x 0,17 mm)	H. Saur, Reutlingen
Deckgläser (18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)

<b>Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 15 mL, 50 mL)</b>	Sarstedt, Nürnberg
<b>Spritzen, Kanülen</b>	Sarstedt, Nürnberg
<b>Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter (10K)</b>	Merck Millipore, Darmstadt
<b>Software</b>	
<b>Volocity Version 5</b>	PerkinElmer, Waltham (USA)
<b>Prism Version 5</b>	GraphPad Software, La Jolla (USA)
<b><i>LabImage 1D</i> L340</b>	Kapelan Bio-Imaging, Leipzig
<b>Photoshop CS5</b>	Adobe, San Jose (USA)
<b>Office 2013</b>	Microsoft, Redmond (USA)
<b>LAS AF Version 2.7 und 3.2</b>	Leica Microsystems, Wetzlar
<b>Leica <i>Confocal Software</i> Version 2.61</b>	Leica Microsystems, Wetzlar

### 3. Ergebnisse

Diese Arbeit entstand auf der Grundlage, dass bei einer Proteinanalyse von exozytotischen Transportvesikeln in polaren Epithelzellen die große GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) identifiziert wurde (Greb, 2011). So fand man Mx1 in, nach Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)-Export isolierten Vesikeln, die positiv für den Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup>-GFP (p75-GFP) waren und *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Plasmamembran transportiert wurden. Im folgenden Teil soll zunächst eine Charakterisierung von Mx1 im Zusammenhang mit exozytotischen *post*-Golgi Vesikeln und verschiedenen Komponenten des intrazellulären Proteintransports erfolgen. Des Weiteren wird gezeigt, ob Mx1 nicht nur mit p75-GFP-positiven Vesikeln assoziiert ist, sondern auch eine Funktion in ihrem Transport ausübt. Im letzten Abschnitt wird auf die Proteinsynthese von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarisation und in verschiedenen zellulären Systemen eingegangen.

Zur Untersuchung der intrazellulären Transportvorgänge in polaren Epithelzellen wurden in dieser Arbeit MDCK-Zellen als Modellzelllinie verwendet (Gaush *et al.*, 1966). Auch die analysierten Vesikel, bei denen Mx1 von Christoph Greb gefunden wurde, stammten aus dieser Zelllinie. Mx-Proteine gelten laut Literatur allgemein als streng Interferon-induziert (Haller und Kochs, 2002). Nakamura und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass canines Mx1 in dieser Zelllinie auf einem endogenen Level ohne Interferoninduktion synthetisiert wird (Nakamura *et al.*, 2005). Daher wurde diese große GTPase in den verschiedenen Studien dieser Arbeit vorwiegend immunologisch durch Antikörper markiert bzw. nachgewiesen. Auch auf die Expression von Fusionsproteinen wie z. B. Mx1-GFP oder anderer zellulärer Transportproteine wurde weitgehend verzichtet, um mögliche Artefakte bzw. Auswirkungen durch überexprimierte Proteine auszuschließen.

#### 3.1 Validierung der Mx1-Antikörperspezifität

Bei einer Antikörpermarkierung ist es essentiell vorher geprüfte und spezifische Antikörper zu verwenden, um falsch-positive Signale und unspezifische Bindungen auszuschließen. Im Hinblick auf die Zunahme nicht-spezifischer Antikörper, gerade im kommerziell-erhältlichen Bereich, ist eine genaue Validierung daher wichtig. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Antikörper gegen Mx1 verwendet (siehe Tabelle 2.6) und für weitergehende Studien zunächst auf ihre Spezifität gegen ihr Epitop getestet. Dazu wurden MDCK-Zellen mit Mx1-GFP transfiziert und eine indirekte Immunfluoreszenz (IF) mit den drei Antikörpern durchgeführt. Vorab ist anzumerken, dass MDCK-Zellen die Mx1-GFP exprimieren (MDCK\_Mx1-GFP) das gleiche Verteilungsmuster und die gleiche Lokalisation für Mx1 aufzeigen, wie bei einer endogenen Mx1-Färbung (Greb, 2011). Betrachtet man die konfokalen Aufnahmen der Immunfärbung mit den drei Mx1-Antikörpern visualisiert durch Alexa Fluor 647 (A647), so sieht man, dass nicht nur die beiden monoklonalen Antikörper Mx1 M143 und Mx1 2G12 sondern auch der verwendete polyklonale Antikörper Mx1 pAb nahezu identisch mit Mx1-GFP kolokalisieren (siehe Abbildung 3.1 A-C). Das Fusionsprotein und die Immunfärbung zeigten sowohl eine vesikuläre, als auch eine schwache diffuse zytoplasmische Färbung, wie es für Mx1 bereits bekannt ist

(Jatani und Mittal, 2004, Haller *et al.*, 2007, Brantis-de-Carvalho *et al.*, 2015). Als Kontrolle für ein Protein, welches nicht mit Mx1 assoziiert ist und daher keine Kolokalisierung aufzeigen sollte, wurde SI-YFP transfiziert und Mx1 in einer IF gegengefärbt (siehe Abbildung 3.1 D). Mit Hilfe der Software LAS AF (Leica Microsystems) wurden kolokalisierte Bereiche zwischen den Fusionsproteinen Mx1-GFP bzw. SI-YFP und der Immunfärbung weiß hervorgehoben. Die generierten *scatterplots* zeigen eine Intensitätsverteilung der einzelnen Pixel aus beiden Aufnahmekanälen (grün = Fusionsprotein, rot = Immunfärbung), wobei Pixel mit starker Fluoreszenzintensität am äußeren Rand der x- bzw. y-Achse abgebildet sind und Pixel mit schwacher Intensität am Ursprung der Achsen akkumulieren. Bei einer Kolokalisierung sind die Pixel im Bereich der 45°-Achse verteilt und werden orange-gelb dargestellt, wie es bei der Auswertung der Aufnahmen von Mx1-GFP mit den drei Antikörpern der Fall ist. Die Färbung zwischen Mx1-GFP und Mx1 pAb-A647 war von geringer Intensität, daher sind im *scatterplot* die Pixel am Achsenursprung verteilt. Eine Kolokalisierung zwischen Antikörper und Fusionsprotein ist hier trotzdem gegeben, wie man in den konfokalen Aufnahmen oder der hervorgehobenen Kolokalisierung erkennen kann. Die Kontrollfärbung mit SI-YFP und Mx1 M143-A647 zeigt kaum kolokalisierte Bereiche, was sich auch in einer separaten Verteilung der roten und grünen Pixel entlang der Achsen im *scatterplot* widerspiegelt. Zur weiteren Validierung der Antikörper wurde dieser Versuch ebenfalls in COS-7-Zellen durchgeführt. Auch hier weisen Mx1-GFP und die Immunfärbungen einen sehr hohen Kolokalisierungsgrad auf (siehe Abbildung 5.1). Durch die starke Fluoreszenzintensität des Fusionsproteins verschieben sich die Pixel im *scatterplot* teilweise zum grünen Kanal. Betrachtet man jedoch die konfokalen Aufnahmen und die dargestellte Kolokalisierung, wird auch hier die Spezifität der Antikörper bestätigt. Zum Abschluss wurde überprüft, ob die endogene Färbung zwischen den Antikörpern übereinstimmt. Dazu wurde der polyklonale Antikörper jeweils mit den beiden monoklonalen Antikörpern in einer IF in MDCK-Zellen kombiniert. Abbildung 3.2 zeigt eine deutliche Kolokalisierung zwischen Mx1 pAb und Mx1 M143 bzw. Mx1 pAb und Mx1 2G12. Die drei Antikörper detektieren somit in der Immunfärbung das gleiche Protein, wobei das Erkennen von Mx1 durch die Kolokalisierung mit Mx1-GFP erwiesen wurde.

### Abbildung 3.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen (I)

(siehe nächste Seite) MDCK-Zellen wurden mit Mx1-GFP (A-C) oder SI-YFP (D) transfiziert, nach Erreichen der Polarität fixiert und eine Immunfluoreszenz mit verschiedenen Mx1-Antikörpern durchgeführt. Die Präparate wurden im KLSM betrachtet. Transfektion: Kanal des transfizierten Fluoreszenzproteins (grün), Antikörper: Kanal des verwendeten Mx1-Erstantikörpers mit dem Alexa Fluor 647-gekoppelten Zweitantikörper (rot), Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kolokalisierung: Mit Hilfe der Software LAS AF (Leica Microsystems) wurden kolokalisierte Bereiche aus dem Overlay weiß dargestellt, Scatterplot: Verteilung der Fluoreszenzintensität aus beiden Kanälen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M.

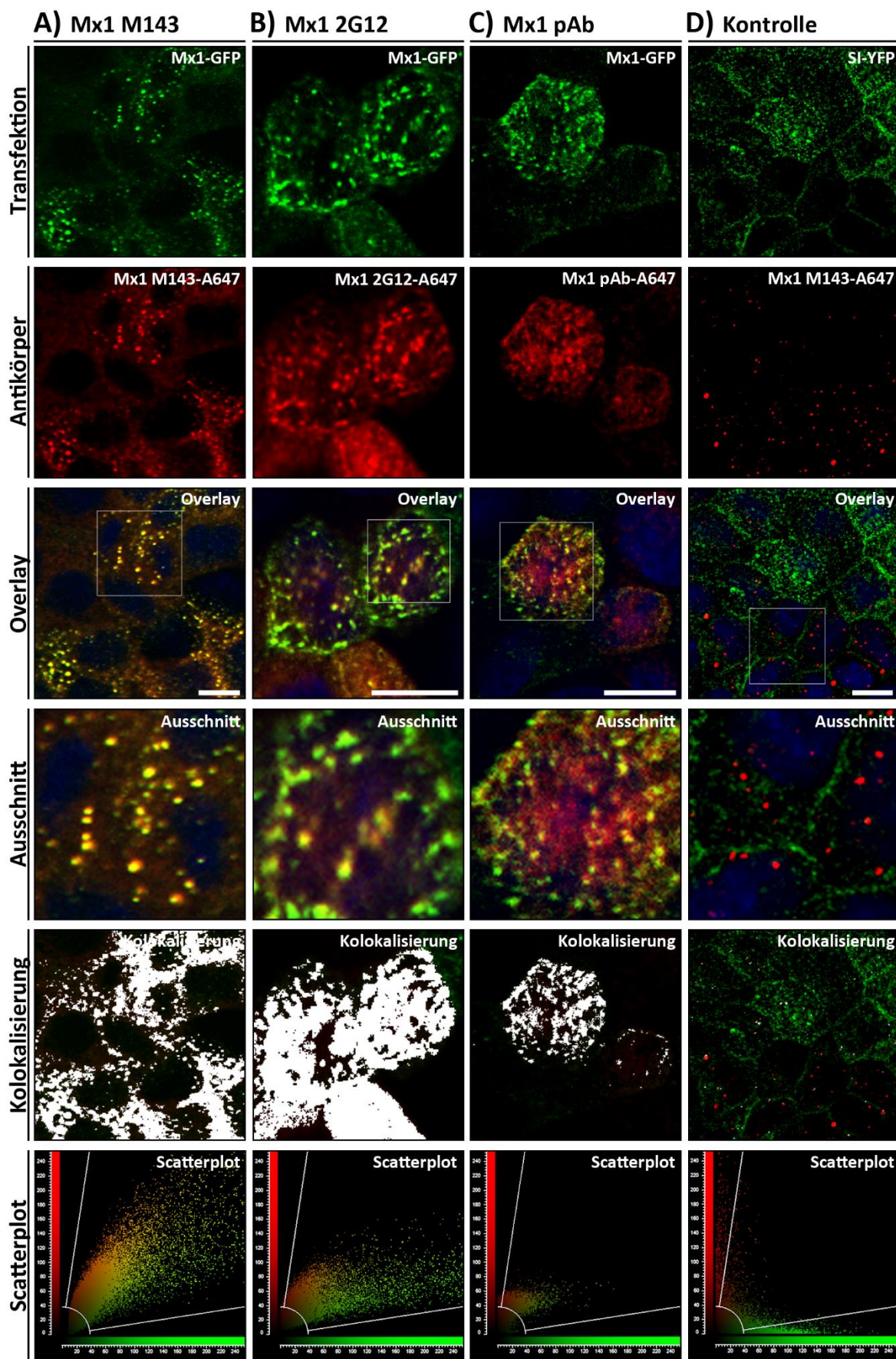
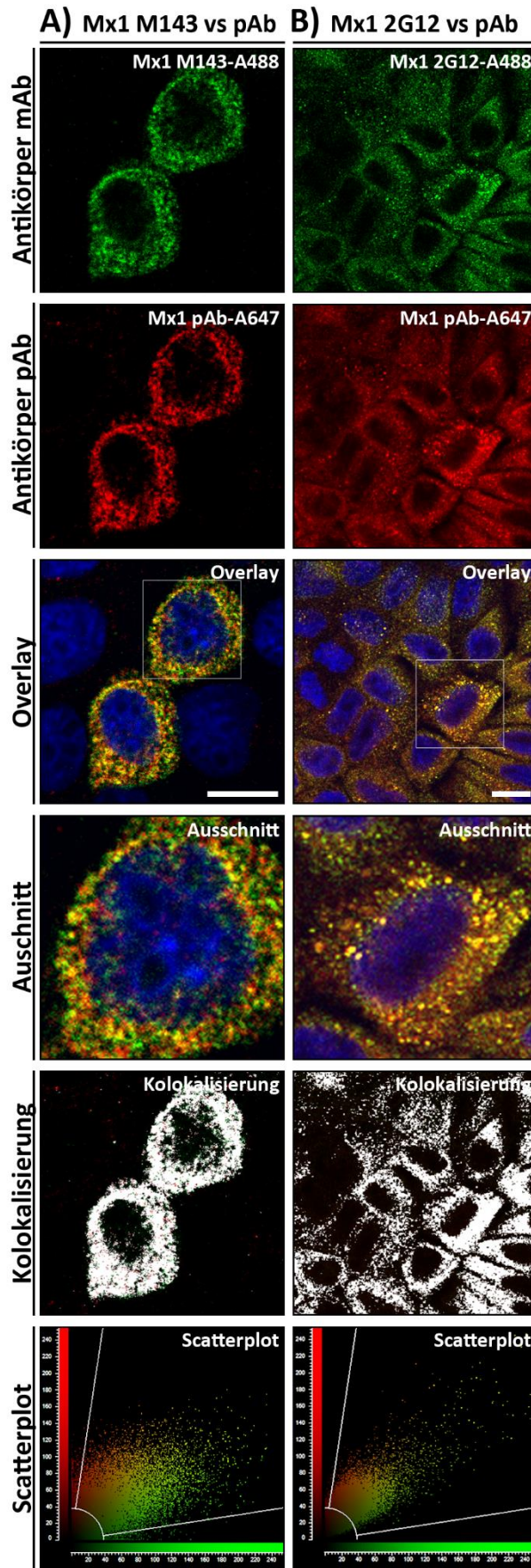


Abbildung 3.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen (I)

Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite



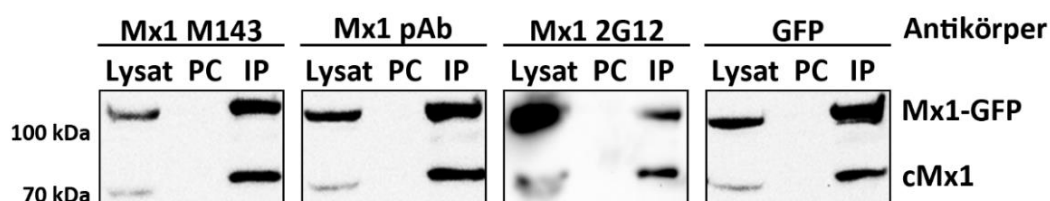


**Abbildung 3.2: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen (II)**

MDCK-Zellen wurden nach Erreichen der Polarität fixiert und eine Immunfluoreszenz mit je zwei verschiedenen Mx1-Antikörpern durchgeführt. Die Analyse erfolgte im KLSM. Antikörper mAb: Kanal des verwendeten monoklonalen Mx1-Erstantikörpers mit dem Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörper (grün), Antikörper pAb: Kanal des verwendeten polyklonalen Mx1-Erstantikörpers mit dem Alexa Fluor 647-gekoppelten Zweitantikörper (rot), Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kolokalisierung: Mit Hilfe der Software LAS AF wurden kolokalisierte Bereiche aus dem Overlay weiß dargestellt, Scatterplot: Verteilung der Fluoreszenzintensität aus beiden Kanälen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M.

Die Antikörperspezifität wurde auch auf dem biochemischen Weg mittels Immunpräzipitation (IP) überprüft. Dazu wurden MDCK\_Mx1-GFP-Zellen lysiert und die Zelllysate mit den drei Mx1-Antikörpern oder einem GFP-Antikörper inkubiert. Die Immunkomplexe wurden nachfolgend isoliert und über eine SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe Abbildung 3.3). Im Lysat erkennt man zwei spezifische Banden, eine für endogenes Mx1 (ca. 74 kDa) und eine für das Fusionsprotein Mx1-GFP (ca. 106 kDa). Im *preclearing* (PC) ist zu erkennen, dass Mx1 nicht unspezifisch an die, zum Isolieren der Immunkomplexe, verwendeten Agarosebeads band. Die IP-Proben dagegen zeigen, dass mit allen vier Antikörpern Mx1 präzipitiert werden konnte. Die drei Mx1-Antikörper banden dabei sowohl das endogene Protein (cMx1), als auch Mx1-GFP. Interessant ist zu sehen, dass der GFP-Antikörper, welcher nur das Fusionsprotein erkennen kann, auch cMx1 co-immunpräzipitierte. Hier wird gleichzeitig die Eigenschaft von Mx1 deutlich, welches in der Lage ist mit sich selbst Homooligomere auszubilden (Kochs *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2010, von der Malsburg *et al.*, 2011).

Auf Grundlage der Immunfluoreszenz- und biochemischen Analyse wurde die Spezifität der drei Mx1-Antikörper gegen ihr Epitop bestätigt und sie waren somit geeignet die große GTPase in den folgenden Experimenten dieser Arbeit zu detektieren.



**Abbildung 3.3: Biochemische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen**

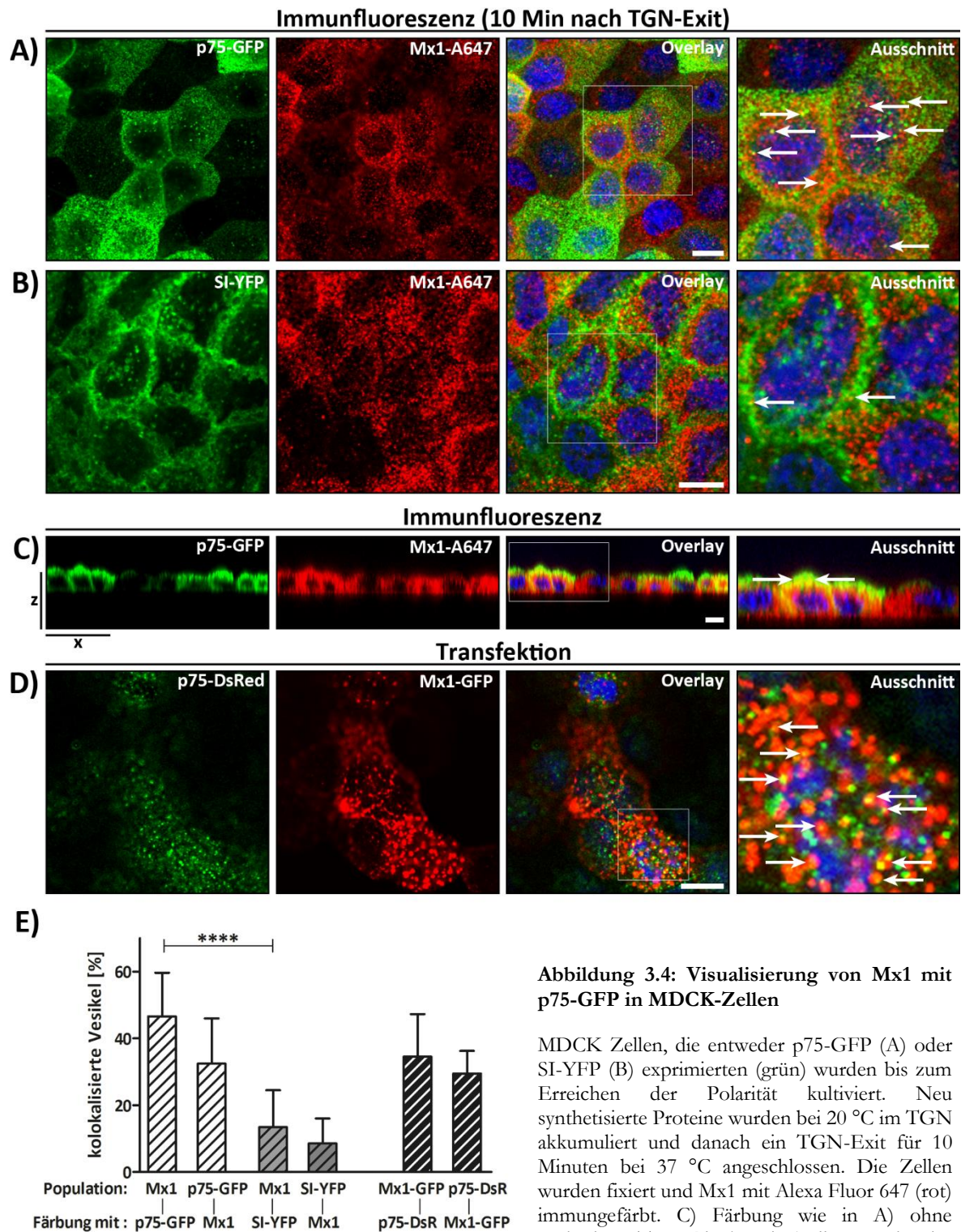
MDCK Zellen, die Mx1-GFP exprimierten wurden lysiert und eine Immunpräzipitation mit drei verschiedenen Mx1- und einen GFP-Antikörper durchgeführt. Die durch Agarosebeads isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Mx1 im Westernblot detektiert. PC: *preclearing*, IP: Immunpräzipitation, Antikörper: In der IP verwendeter Antikörper. Die Doppelbanden entsprechen dem Fusionsprotein Mx1-GFP und endogenem caninen Mx1 (cMx1). In Zusammenarbeit mit K. Ringer.

### 3.2 Kolokalisierung mit exozytotischen p75-GFP-positiven Transportvesikeln

In polaren Epithelzellen existieren unterschiedliche Transportrouten für verschiedene apikal sortierte Cargoproteine (Rodriguez-Boulau und Musch, 2005, Cramm-Behrens *et al.*, 2008, Guerriero *et al.*, 2008, Folsch *et al.*, 2009). Es wurde herausgefunden, dass Mx1 5-15 Minuten (min) nach TGN-Exit gezielt mit Transportvesikeln assoziiert ist, die *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Plasmamembran in MDCK-Zellen transportiert werden (Greb, 2011). So wurde Mx1 bei einer IP von p75<sup>NTR</sup>- und Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)-tragenden Vesikeln detektiert, zwei *raft*-unabhängig beförderte Proteine, jedoch nicht bei Vesikeln positiv für die *raft*-abhängig transportierte Saccharase-Isomaltase (SI). Die Ergebnisse der biochemischen Analyse sollten nun mittels IF bestätigt werden. Dazu wurden in MDCK-Zellen, die entweder p75-GFP oder SI-YFP stabil exprimierten neu synthetisierte Proteine im TGN bei 20 °C akkumuliert, die Zellen danach für 10 min bei 37 °C für einen TGN-Exit inkubiert und dann fixiert. Im Anschluss wurde endogenes Mx1 mittels Immunfärbung visualisiert und die Zellen im KLSM betrachtet. Man erkennt für p75-GFP und SI-YFP vesikuläre Strukturen, die teilweise ebenfalls für Mx1 positiv sind (siehe Abbildung 3.4 A und B). Eine Quantifizierung der Aufnahmen wurde mittels des Manders Kolokalisierungskoeffizienten und der Software Volocity (Perkin Elmer) durchgeführt (siehe Punkt 2.4.2). Diese macht deutlich, dass signifikant mehr Vesikel doppelt-positiv sind für Mx1 und p75-GFP (47%), als für Mx1 und SI-YFP (ca. 13%; siehe Abbildung 3.4 E). MDCK-Zellen, die mit p75-DsRed und Mx1-GFP transfiziert wurden, wiesen ebenfalls kolokalisierte Vesikel (ca. 35% für Mx1-GFP mit p75-DsRed) ohne vorangegangene TGN-Akkumulation auf (siehe Abbildung 3.4 D und E). Die konfokale Aufnahme von MDCK\_p75-GFP-Zellen und endogenem Mx1 in x/z-Ebene, zeigt die überwiegend apikale Lokalisation für p75-GFP, wobei zu erkennen ist, dass eine Kolokalisierung zwischen dem Membranprotein und der großen GTPase im subapikalen Bereich der Zellen vorliegt (siehe Abbildung 3.4 C).

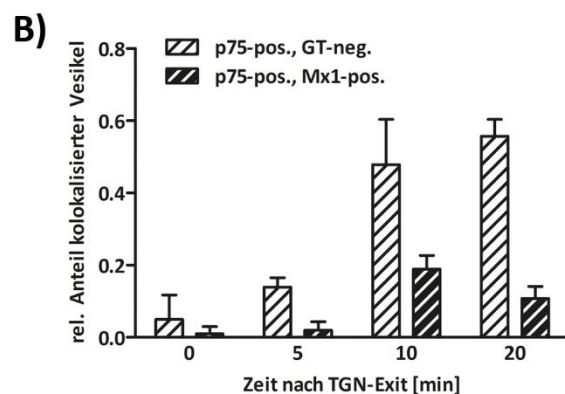
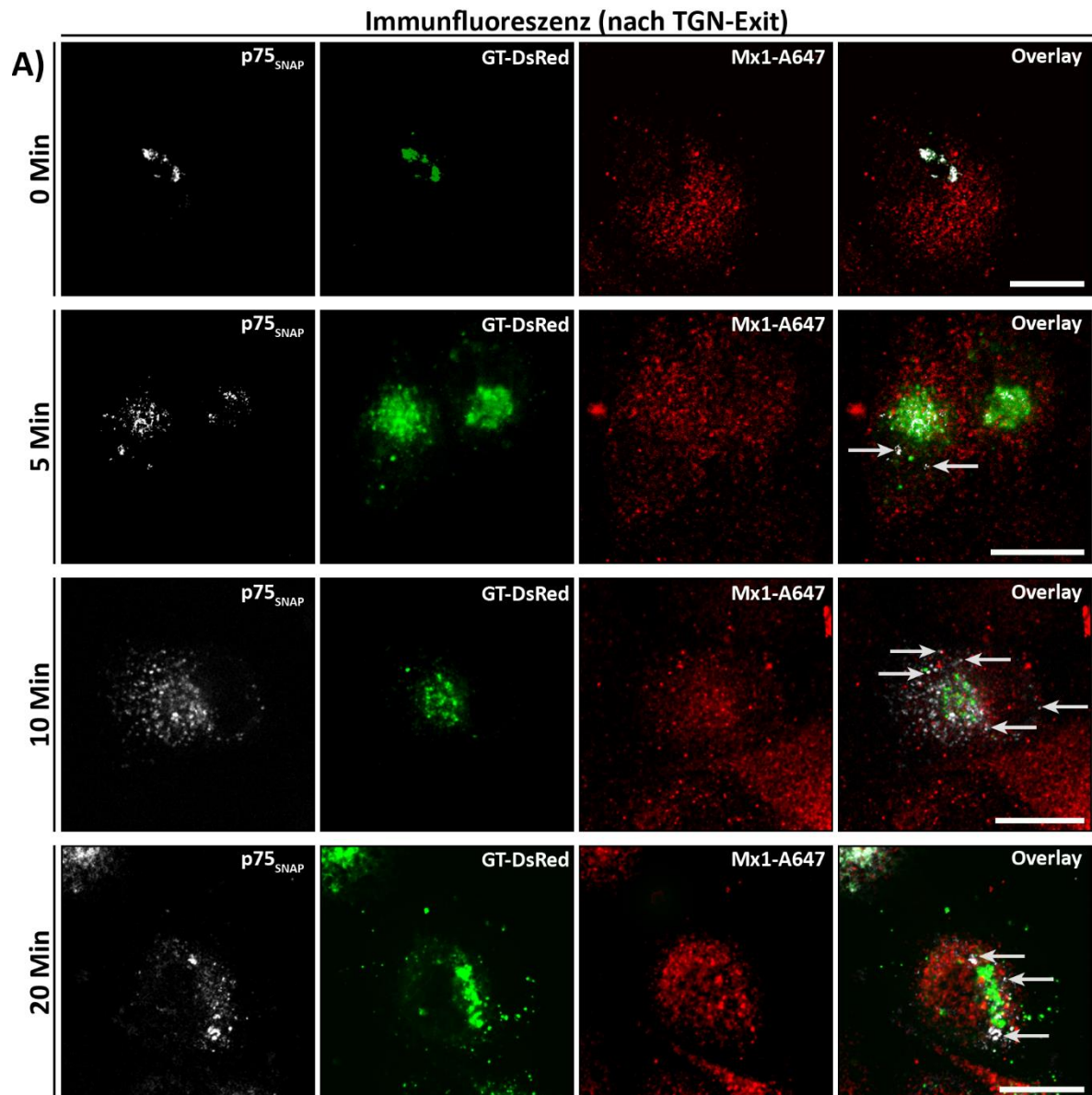
In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob tatsächlich neu synthetisiertes p75<sup>NTR</sup> zusammen mit Mx1 kolokalisiert, was durch den TGN-Block und der nachfolgenden Entlassung neuer Proteine sichergestellt werden sollte. Um die Effektivität dieses Blocks zu überprüfen, wurde die SNAP-tag-Technik verwendet, mit der es möglich ist in lebenden Zellen eine Population neu synthetisierter Proteine gezielt zu markieren und vom bereits vorhandenen Proteinpool zu unterscheiden (siehe Punkt 2.3.9; Keppler *et al.*, 2003, Keppler *et al.*, 2004). Dazu wurde p75<sup>NTR</sup> C-terminal mit dem SNAP-tag gekoppelt (p75<sub>SNAP</sub>) und MDCK-Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert (Straube *et al.*, 2013). Mit Hilfe eines Blocksubstrates wurde vorhandenes p75<sub>SNAP</sub> maskiert und im Anschluss eine TGN-Akkumulation bei 20 °C durchgeführt. Neu synthetisiertes unmaskiertes p75<sub>SNAP</sub> wurde mit Oregon Green angefärbt, danach fand eine Inkubation der Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37 °C zum Entlassen der Proteine aus dem TGN statt. Das TGN wurde durch die Transfektion von Galaktosyltransferase (GT)-DsRed und Mx1 durch IF visualisiert (siehe Abbildung 3.5 A). Bei Betrachtung im KLSM sah man, dass neu hergestelltes p75<sub>SNAP</sub> bei 0 min, also unmittelbar nach dem TGN-Block, ausschließlich im TGN lokalisiert war. Das Membranprotein kolokalisierte hier stark mit GT-DsRed und nur kaum mit Mx1.





**Abbildung 3.4: Visualisierung von Mx1 mit p75-GFP in MDCK-Zellen**

MDCK Zellen, die entweder p75-GFP (A) oder SI-YFP (B) exprimierten (grün) wurden bis zum Erreichen der Polarität kultiviert. Neu synthetisierte Proteine wurden bei 20 °C im TGN akkumuliert und danach ein TGN-Exit für 10 Minuten bei 37 °C angeschlossen. Die Zellen wurden fixiert und Mx1 mit Alexa Fluor 647 (rot) immungefärbt. C) Färbung wie in A) ohne vorherigen TGN-Block. Die Zellen wurden im x/z-Scan aufgenommen. D) MDCK-Zellen wurden doppelt transfiziert mit p75-DsRed (grün) und Mx1-GFP (rot) und im polaren Zustand fixiert. Alle Aufnahmen wurden mit dem KLSM produziert. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10 µM. Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerter Bildbereich aus dem Overlay (siehe Kasten). Kolokalisierte Strukturen wurden mit Pfeilen markiert. E) Quantifizierung der Kolokalisierung aus A) zwischen endogenem Mx1 und p75-GFP (n=12), aus B) zwischen endogenem Mx1 und SI-YFP (n=16) oder D) zwischen p75-DsRed und Mx1-GFP (n=9) nach Manders. Kolokalisierte Vesikel wurden normalisiert gegen die Summe der jeweiligen Population. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD),  $p < 0.001$ .



**Abbildung 3.5: Immunfluoreszenz von Mx1 und p75<sub>SNAP</sub> nach TGN-Exit**

A) MDCK-Zellen wurden transient mit p75<sub>SNAP</sub> (weiß) und dem Golgi-Marker Galaktosyltransferase (GT)-DsRed (grün) transfiziert und bis zu ihrer Polarität kultiviert. Vorhandenes p75<sub>SNAP</sub> wurde durch die Inkubation mit SNAP-Cell Block für 20 min maskiert und neu synthetisiertes p75-SNAP im TGN bei 20 °C für 12 h akkumuliert. Mit Oregon Green wurden neu synthetisierte Proteine dabei angefärbt und ein

TGN-Exit bei 37 °C für unterschiedliche Zeitpunkte angeschlossen. Die Zellen wurden fixiert und eine Immunfärbung mit anti-Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) durchgeführt. Die Präparate wurden im KLSM analysiert. Overlay: Überlagerung der drei Kanäle. Pfeile markieren p75<sub>SNAP</sub>- und Mx1-A647-positive Strukturen. Größenbalken: 10 µm. B) Zur Quantifizierung wurden p75<sub>SNAP</sub><sup>+</sup>/GT<sup>-</sup>-oder p75<sub>SNAP</sub><sup>+</sup>/Mx1<sup>+</sup>-Vesikel gegen die Summe von p75<sub>SNAP</sub><sup>+</sup>-Strukturen normalisiert. Daten sind dargestellt als MW ± SD von drei unabhängigen Experimenten. In Zusammenarbeit mit E. Hönig.

5-20 min nach TGN-Exit nahm die Kolokalisierung mit GT-DsRed ab und mit Mx1 zu, wobei 10 min nach TGN-Exit der höchste Anteil von p75<sup>SNAP</sup> mit Mx1 assoziiert war (siehe Abbildung 3.5 B).

Durch dieses Experiment konnte bestätigt werden, dass Mx1 spezifisch mit neu synthetisiertem p75<sup>SNAP</sup>, welches sich im exozytotischen Transportweg zur apikalen Membran befindet, kolokalisiert. Die IF zeigte, dass eine Kolokalisierung beider Proteine im subapikalen Bereich polarer Epithelzellen besteht. Eine Assoziation mit der *lipid raft*-abhängig apikal sortierten SI konnte mikroskopisch nicht nachgewiesen werden, sodass Mx1 gezielt, auch unter Beachtung der biochemischen Daten, mit Proteinkomponenten des *lipid raft*-unabhängigen Transportwegs zu interagieren scheint.

### 3.3 Assoziation mit dynamischen intrazellulären Membranen

Canines Mx1 ist, wie humanes MxA, ein zytosolisch vorliegendes Protein (Nakamura *et al.*, 2005, Haller *et al.*, 2007). In MDCK-Zellen weist Mx1 jedoch keine rein diffuse zytosolische Färbung auf, sondern ist, wie in den vorherigen Abbildungen zu sehen, mit vesikulären Strukturen assoziiert. Um diese Assoziation genauer zu untersuchen wurde die hochauflösende *Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return* (GSDIM) verwendet, mit der theoretische Auflösungen von 20 nm erreicht werden können (siehe Punkt 2.3.3; Fölling *et al.*, 2008). Zunächst wurde Mx1 in MDCK-Zellen durch eine IF visualisiert und im Anschluss die apikale Domäne mittels TIRF-Mikroskopie (*Apical* TIRFM) betrachtet (siehe Abbildung 3.6 A links). Zu erkennen sind vesikuläre Formen, die sich in unmittelbarer Nähe (~90 nm) zur Plasmamembran befinden. *Apical* TIRFM in Kombination mit GSDIM löst diese punktförmigen Vesikel in Ringstrukturen mit Durchmessern von 200-400 nm auf (siehe Abbildung 3.6 A rechts). Mx1 scheint somit gezielt mit Membranen von Vesikeln zu interagieren und nicht nur frei bzw. ungebunden im Zytosol vorzuliegen.

Intrazelluläre Transport- und Sortierprozesse werden von einem komplexen und hoch dynamischen System realisiert. Da Mx1 eine Bindung an *post*-Golgi Transportvesikel aufweist, ist es interessant mehr über die Dynamik von Mx1-positiven Membranen zu erfahren. Hierzu eignet sich *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP), eine mikroskopische Methode mit der intrazelluläre dynamische Prozesse in lebenden Zellen dargestellt und gemessen werden können (siehe Punkt 2.3.6; Axelrod *et al.*, 1976).

#### Abbildung 3.6: GSDIM- und FRAP-Analyse von Mx1-positiven Strukturen

(siehe nächste Seite) A) Die *Apical* TIRF-Mikroskopie von polaren MDCK-Zellen zeigte vesikuläre Strukturen für immungefärbtes Mx1/Alexa Fluor 647 (linke Seite). Hochauflösende apikale GSDIM TIRF-Mikroskopie von derselben Region visualisierte eine spezifische Membranassoziation von Mx1 (rechte Seite, siehe Pfeile). Zellgrenzen werden als gestrichelte Linie dargestellt, die Fluoreszenzintensitätsverteilung als *Lookup*-Tabelle (LUT). Größenbalken: 5 µm. B) Beispiel eines FRAP-Experiments von COS-7-Zellen transfiziert mit Mx1-GFP. *Prebleach*: Zeitpunkt vor dem Bleichen; *Postbleach*: Zeitpunkt unmittelbar nach dem Bleichen; FRAP: Messung der Fluoreszenzerholung mit einer zeitlichen Auflösung von 0,45 s. Der gestrichelte Kreis repräsentiert das gebleichte Areal, der Stern das gebleichte Vesikel. Ab 9,8 s werden erste Mx1-GFP Moleküle am Vesikel sichtbar. Der weiße Pfeil markiert ein Fusionsereignis von zwei weiteren Vesikeln. Größenbalken: 5 µm. C) Die Fluoreszenzintensität wurde mit LAS AF über die Zeit quantifiziert (n=5) und eine Doppel- mit anschließender *Fullscale*-Normalisierung durchgeführt. Mit GraphPad Prism wurde eine Ausgleichsrechnung für eine einfache bzw. zweifache Bindungsfunktion durchgeführt.



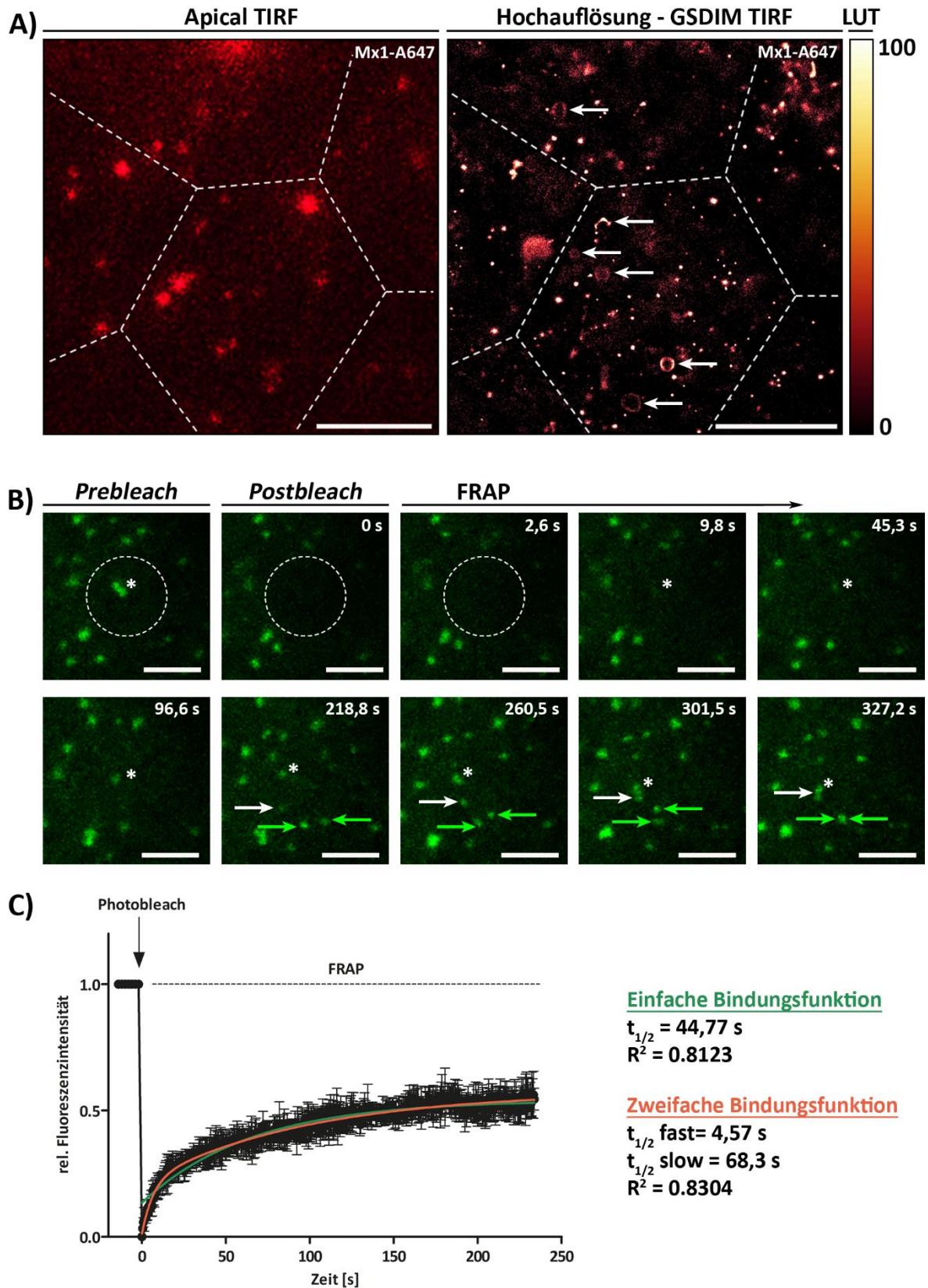


Abbildung 3.6: GSDIM- und FRAP-Analyse von Mx1-positiven Strukturen

Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite

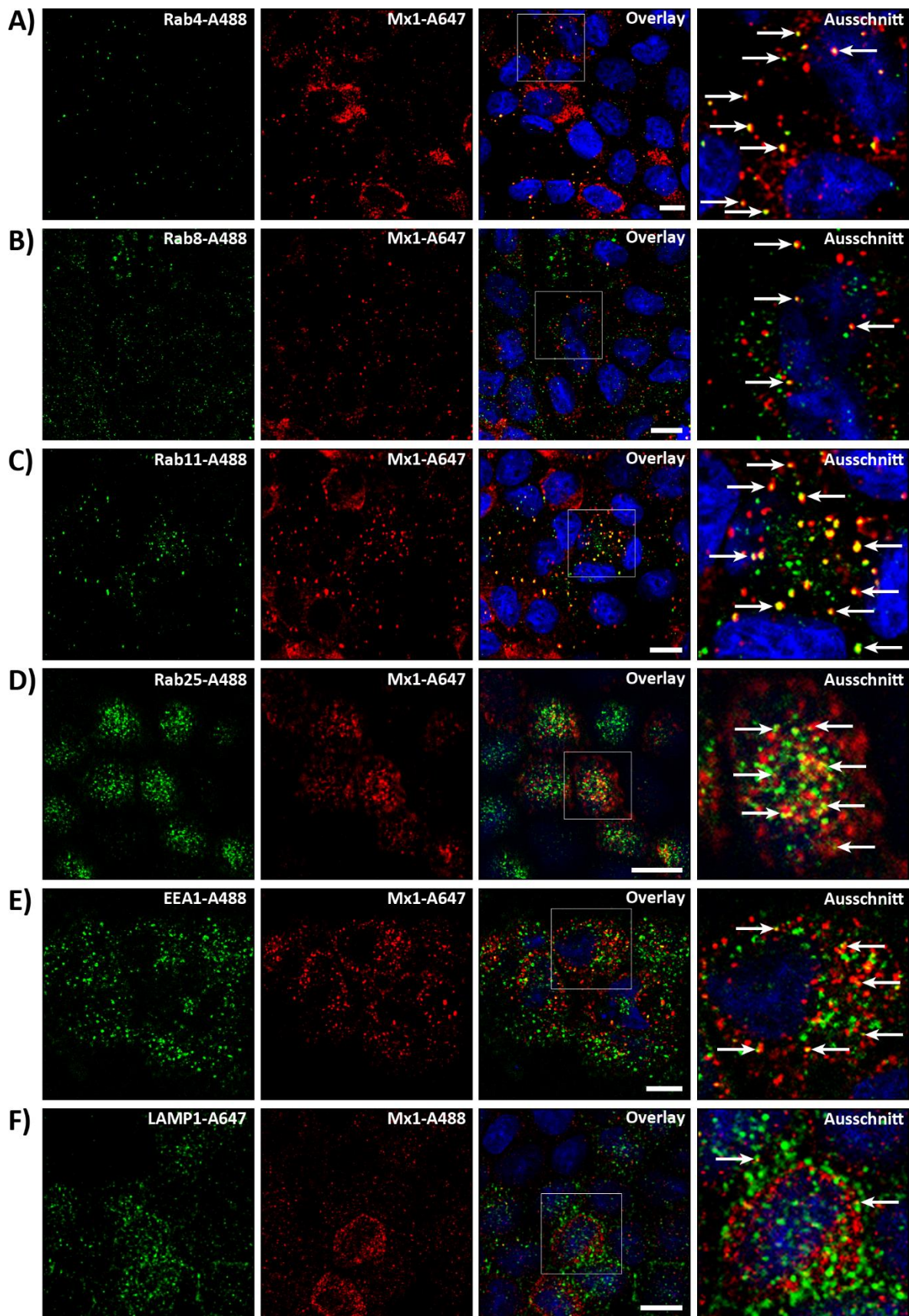
Dafür wurden COS-7-Zellen mit Mx1-GFP transfiziert und FRAP-Experimente bei 37 °C am KLSM durchgeführt. Mit hoher Laserintensität wurden die Fluorophore von Mx1-GFP in einem bestimmten Areal in den Dunkelnzustand versetzt und nachfolgend der Eintritt fluoreszierender Mx1-GFP Moleküle aus der Umgebung in das gebleichte Areal gemessen. Dieses Areal umfasste sowohl eine Mx1-GFP-positive vesikuläre Struktur, als auch einen zytosolischen Bereich (siehe Abbildung 3.6 B *Prebleach*). Durch den starken Laserimpuls wurden alle Fluorophore am Vesikel und im Zytosol in den Dunkelnzustand versetzt (siehe Abbildung 3.6 B *Postbleach*). Bereits wenige Sekunden nach dem Bleichvorgang konnte wieder Mx1-GFP-Fluoreszenz im zytosolischen Bereich des Areals gemessen werden (siehe Abbildung 3.6 FRAP). Nach ungefähr 10 Sekunden wurden auch erste Mx1-GFP Moleküle am gebleichten Vesikel sichtbar, wobei die Stärke der Fluoreszenz dort mit der Aufnahmezeit zunahm. Die Fluoreszenzintensität wurde über den gemessenen Zeitraum quantifiziert, normalisiert und anschließend mit den Messwerten eine Ausgleichsrechnung durchgeführt (siehe Abbildung 3.6 C). Betrachtet man die Zunahme der Fluoreszenzintensität kann man zwei verschiedene Phasen beschreiben: In den ersten Sekunden (ca. 0-10 s) findet eine rapide Zunahme des Fluoreszenzsignals statt, wobei sich diese Zunahme nachfolgend verlangsamt, bis ein Plateau erreicht wird. Um die Dynamik von Mx1-GFP zu beschreiben, können nun zwei verschiedene Funktionen verwendet werden (Sprague und McNally, 2005). Bei einer einfachen Bindungsfunktion beträgt die Halbwertszeit der Fluoreszenzerholung 44,8 s. Bei einer zweifachen Bindungsfunktion wird zwischen einer schnellen ( $t_{1/2 \text{ fast}} = 4,57 \text{ s}$ ) und einer langsamen ( $t_{1/2 \text{ slow}} = 68,3 \text{ s}$ ) Halbwertszeit unterschieden. Betrachtet man die Ausgleichskurven zu den Funktionen, scheint eine zweifache Bindungsfunktion die Messwerte besser zu beschreiben und die unterschiedlichen Phasen der Fluoreszenzerholung von Mx1-GFP widerzugeben.

Mx1 erscheint als ein sehr dynamisches Protein, wobei sowohl die Bewegung innerhalb des Zytosols, als auch erste Bindungsprozesse an zelluläre Membranen im einstelligen Sekundenbereich ablaufen. Diese Dynamik wurde noch durch die Beobachtung verstärkt, dass Mx1-GFP-positive Vesikel während der Aufnahme der FRAP-Experimente miteinander verschmolzen oder sich teilten. Abbildung 3.6 B zeigt vermutlich dabei zwei Fusionsereignisse von Mx1-GFP tragenden Vesikeln.

### 3.4 Immunfluoreszenz mit endosomalen Markerproteinen

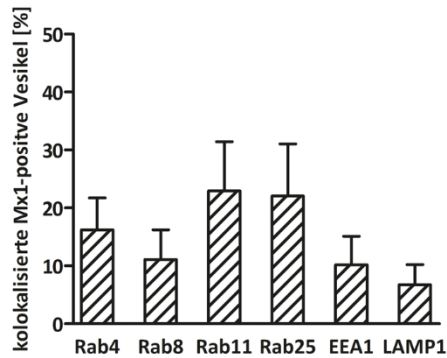
Um die Natur Mx1-positiver Membranen genauer zu beleuchten wurde eine Reihe von IF-Studien mit endosomalen Markerproteinen durchgeführt. Endosomen gelten als Transport- und Sortierstationen für den intrazellulären Proteintransport. Sie sind charakterisiert durch eine bestimmte Protein- und Lipidzusammensetzung. Zum Beispiel sind Familienmitglieder der Rab-Proteine mit bestimmten endosomalen Membranen assoziiert, wo sie die Bildung, das Andocken und die Fusion von Vesikeln kontrollieren (Stenmark, 2009). *Lipid raft*-unabhängig transportierte Proteine durchlaufen auf dem Weg zur Plasmamembran verschiedene dieser Kompartimente, darunter Rab4-, Rab8- und Rab11-positive Endosomen (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Zunächst wurde daher eine mögliche Kolo-kalisation von endogenem Mx1 mit diesen drei Rab-Proteinen untersucht.





**Abbildung 3.7: Immunfluoreszenz mit endosomalen Markerproteinen in MDCK-Zellen**

A)-F) Polare MDCK-Zellen wurden fixiert und Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) mit verschiedenen endosomalen Markerproteinen/Alexa Fluor 488 (grün), mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Im Overlay sind beide Kanäle überlagert. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Die Pfeile zeigen auf doppelt-positive Strukturen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken: 10 µM.



**Abbildung 3.8: Quantifizierung der IF mit endosomalen Markerproteinen in MDCK-Zellen**

Quantifizierung der Kolokalisierung von Mx1 mit Rab4 (n=12), Rab8 (n=21), Rab11 (n=13), Rab25 (n=7), EEA1 (n=13) und LAMP1 (n=7) dargestellt wie in A-F) nach Manders mit Hilfe der Software Volocity (Perkin Elmer). Normalisiert wurde gegen die Summe aller Mx1-positiven Vesikel. Die Daten repräsentieren MW  $\pm$  SD.

In Abbildung 3.7 A-C ist zu sehen, dass Mx1 mit jeweils allen drei Proteinen in denselben vesikulären Strukturen vorlag. Die Quantifizierung zeigt, dass die Kolokalisierung mit Rab11 dabei am prominentesten war (siehe Abbildung 3.8). Ca. 23 % der Mx1-positiven Vesikel waren auch positiv für diese kleine GTPase. Die Assoziation zwischen Mx1 und Rab4, Rab8 und Rab11 wurde auch durch eine IF in COS-7-Zellen bestätigt (siehe Abbildung 5.2 A-C,G). Hier findet man die größte Kolokalisierung allerdings zwischen Mx1 und Rab4 (ca. 32 %). Rab25 ist eine weitere Rab-GTPase, welche an Transportprozessen in apikalen Recyclingendosomen beteiligt ist und zur Rab11-Unterfamilie gehört (Casanova *et al.*, 1999). Mx1 zeigte ebenfalls auf dem gleichen Level (ca. 22 %) wie mit Rab11 eine Assoziation mit Rab25-positiven Membranen (siehe Abbildungen 3.7 D und 3.8). Als weitere Markerproteine für frühe bzw. späte oder lysosomale endosomale

Kompartimente gelten EEA1 bzw. LAMP-1 (Chen *et al.*, 1988, Mu *et al.*, 1995). Sie wurden ebenfalls über Immunfärbung zusammen mit Mx1 visualisiert (siehe Abbildung 3.7 E-F). Für EEA1 und Mx1 fand man eine Mehrzahl doppelt-positiver Vesikel (10 %), wohingegen weniger Kolokalisierung zwischen LAMP-1 und Mx1 auszumachen war (ca. 7 %; siehe Abbildung 3.8).

Diese IF-Analyse weist darauf hin, dass Mx1 in polaren und unpolaren Zellen mit endosomalen Membranen interagiert, die an intrazellulären Transport- bzw. Recyclingprozessen beteiligt sind und nicht zur Proteindegradierung führen.

### 3.5 Proximity Ligation Assay

Eine neue und elegante Methode um Proteinassoziationen intrazellulär sichtbar zu machen wird als *Proximity Ligation Assay* (PLA) bezeichnet (siehe Punkt 2.3.8). Der große Vorteil von PLA gegenüber IF dabei ist, dass nur die Orte in der Zelle angezeigt werden, wo zwei Proteine in nächster Nähe (0-40 nm) zu einander vorliegen (Soderberg *et al.*, 2006). Dadurch wird die Gefahr verringert, dass sich zufällig überlappende Strukturen in der IF als Kolokalisierung fehlinterpretiert werden könnten. Da im PLA ebenfalls wie in der IF endogene Proteine immunologisch markiert werden, ist der Einsatz spezifischer Antikörper auch hier entscheidend, um falsch-positive Signale zu verhindern.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörperpaare als Negativ- bzw. Positivkontrolle im PLA verwendet. Ihre Spezifität wurde zunächst in COS-7-Zellen, die mit Mx1-GFP transfiziert wurden, überprüft.  $\beta$ -Catenin und das Ribonukleoprotein hnRNP A2/B1 wurden als Proteine ausgewählt, die nicht miteinander interagieren sollten.  $\beta$ -Catenin befindet sich zum größten Teil an der Zellmembran und im

Zytosol, wo es Aufgaben der Zell-Zell-Adhäsion und der Signaltransduktion nachkommt (Nathke *et al.*, 1994, Tan *et al.*, 2012). HnRNPA2B1 befindet sich in spezifischen Regionen des Zellkerns (*speckles*), wo es am Spleißprozess der *pre*-mRNA beteiligt ist (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1993). Mikrotubuli-abhängige Kif5-Motorproteine und  $\alpha$ -Tubulin wurden dagegen als Interaktionspartner ausgesucht. Tatsächlich kam es in COS-7-Zellen nur zu sehr wenigen PLA-Signalen bei der ausgewählten Negativkontrolle. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen Mx1-GFP-positiv oder -negativ waren (siehe Abbildung 3.9 A). Betrachtet man dagegen die Positivkontrolle, sieht man dass es zwischen Kif5 und  $\alpha$ -Tubulin zu der erwarteten hohen Interaktion kam. Diese fand vermehrt in einem perinukleären Bereich statt und schien ebenfalls nicht durch die Expression von Mx1-GFP beeinflusst zu werden (siehe Abbildung 3.9 B). Zur weiteren Analyse der PLA-Spezifität wurde die Interaktion zwischen Mx1 und GFP untersucht. Zu erwarten war ein PLA-Signal nur in Zellen, die Mx1-GFP-positiv sind, da hier beide Antikörper an Mx1 und an GFP binden konnten. Wie in Abbildung 3.9 C zu sehen ist, gab es in Zellen mit Mx1-GFP-Synthese auch ein starkes PLA-Signal, wobei Zellen ohne Mx1-GFP keine PLA-Fluoreszenz aufwiesen. Im Gegensatz dazu entstanden bei der Verwendung von zwei Mx1-Antikörpern sowohl in Mx1-GFP-positiven als auch -negativen Zellen PLA-Ereignisse (siehe Abbildung 3.9 D). In Zellen ohne Mx1-GFP wurde dabei das endogene Protein erkannt, wodurch auch die hohe Intensität des PLA-Signals in Mx1-GFP überexprimierenden Zellen erklärt werden kann. Betrachtet man die Interaktion der beiden Mx1-Antikörper im Detail, so sieht man dass es am Rand von Mx1-GFP-positiven Vesikeln zu einer Akkumulation von PLA-Ereignissen kam (siehe Abbildung 3.9 E). Hier schien Mx1 gezielt an der Membran dieser Strukturen gehäuft zu lokalisieren, wie es auch in der hochauflösenden GSDIM gesehen wurde.

Mit Hilfe des PLA ist es somit nicht nur möglich Proteinassoziationen aufzuklären, sondern auch direkt den Ort dieser Assoziation sichtbar zu machen. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Kontrollen können dabei als spezifisch angesehen werden. Der PLA wurde daraufhin benutzt, um die Beobachtung der Kolokalisierung von Mx1 mit Rab4, -8 und -11 in COS-7-Zellen zu bestätigen. Tatsächlich zeigte die Kombination von Mx1 mit den drei Rab-Proteinen PLA-Signale (siehe Abbildung 5.2 D-F). Diese waren für Rab4 und Mx1 bzw. Rab11 und Mx1 über die Zelle verteilt. Für Rab8 und Mx1 waren sie gehäuft in einem kernnahen Bereich zu finden, wie es auch in der IF-Analyse zu sehen war.



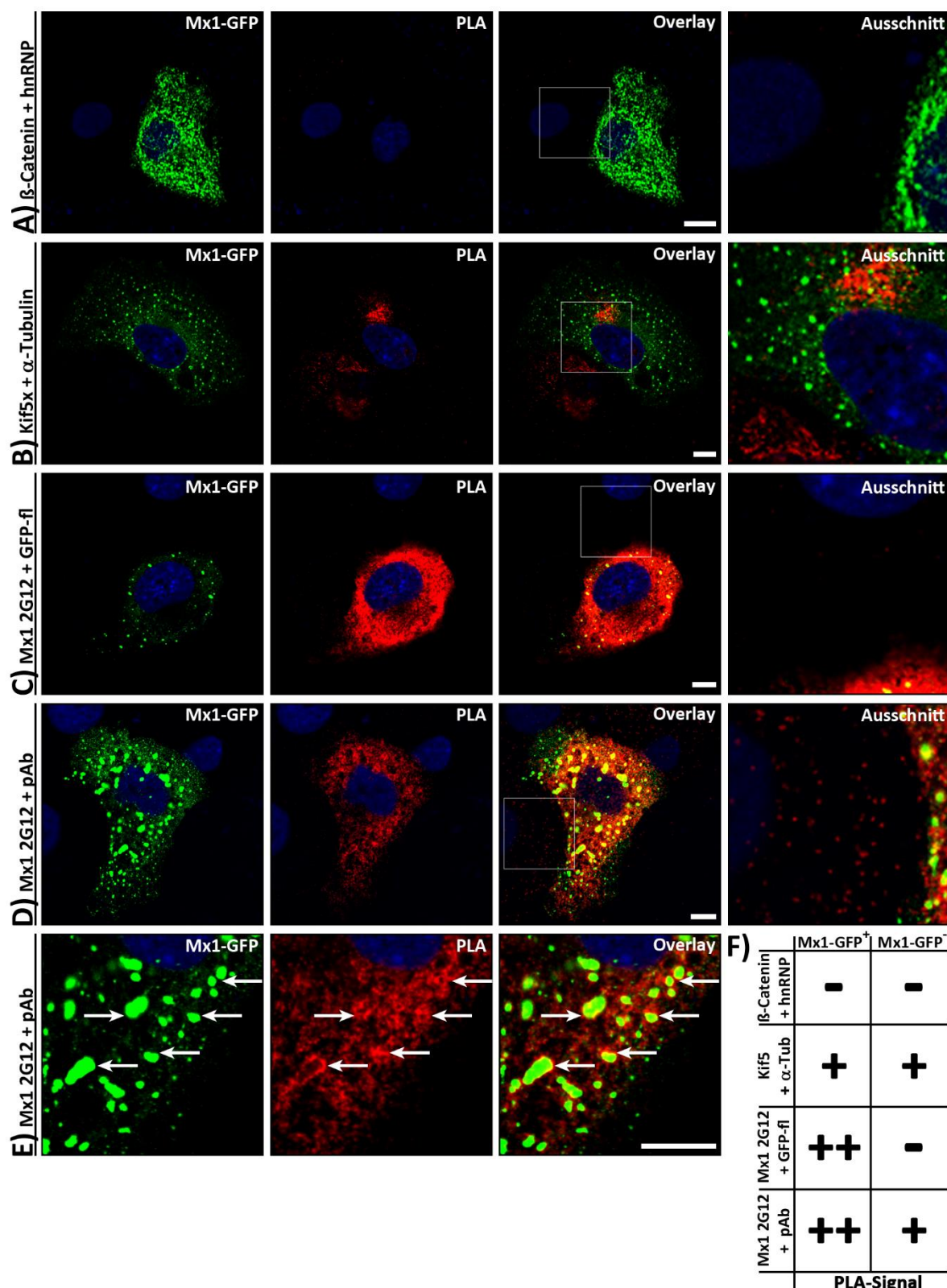


Abbildung 3.9: Spezifitätstest des *Proximity Ligation Assays*

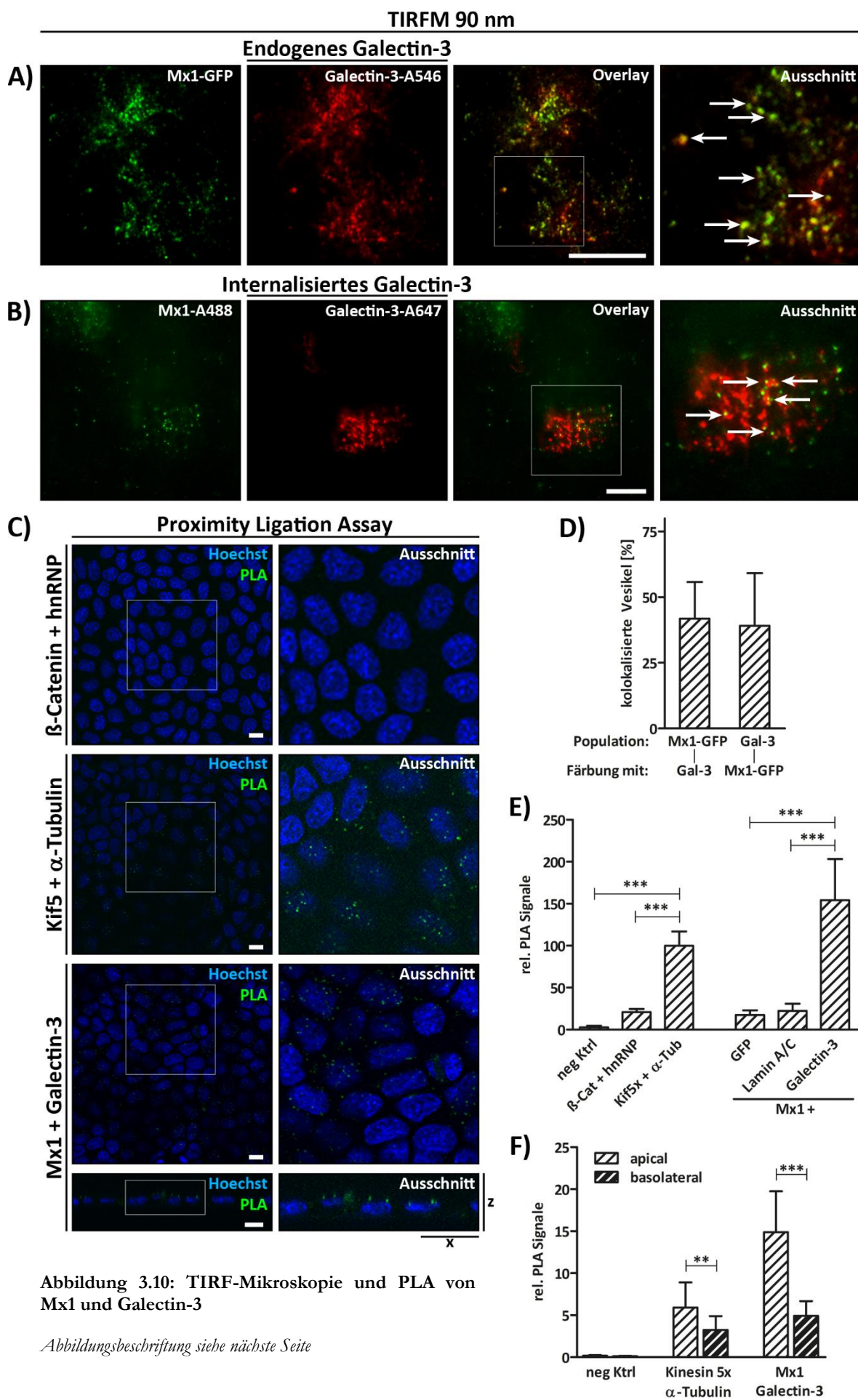
A-D) *Proximity Ligation Assay* (PLA; rot) mit verschiedenen Antikörperpaaren in COS-7-Zellen, die mit Mx1-GFP (grün) transfiziert wurden. Overlay: Übereinanderlagerung von Mx1-GFP und PLA-Signalen; Ausschnitt: Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). E) Vergrößerter Ausschnitt aus D), Pfeile weisen auf vermehrte PLA-Ereignisse am Rand von Mx1-GFP-positiven Strukturen hin. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken: 10  $\mu$ M. F) Graphische Darstellung von A-D). In Zusammenarbeit mit K. Ringer.

### 3.6 Assoziation mit Galectin-3

Ein bedeutendes Protein für apikale Transport- und Sortierprozesse in polaren Epithelzellen ist Galectin-3, ein zuckerbindendes Protein aus der Familie der Lektine. Es konnte gezeigt werden, dass endogenes Galectin-3 in endosomalen Kompartimenten lokalisiert ist und dort u. a. für die richtige Sortierung von nicht *raft*-assoziierten Proteinen wie p75<sup>NTR</sup> essentiell ist (Delacour *et al.*, 2006, Schneider *et al.*, 2010). Darüber hinaus wird exogenes rekombinantes Galectin-3 an der apikalen Membran endozytiert und gelangt in ein Rab11-positives Recyclingendosom, von wo es zusammen mit exozytotischem Material wieder an die Plasmamembran transportiert wird (Straube *et al.*, 2013). Es wurde biochemisch nachgewiesen, dass Mx1 zusammen mit p75<sup>NTR</sup> und Galectin-3 in isolierten Vesikeln vorliegt (Greb, 2011). Ob es sich dabei um apikale endosomale Kompartimente handelt, sollte nun mittels *Apical* TIRFM überprüft werden.

Zunächst wurde endogenes Galectin-3 gemeinsam mit Mx1 visualisiert, wodurch man deutlich sah, dass beide Proteine in denselben apikalen Strukturen lokalisiert waren (siehe Abbildung 3.10 A). Eine Quantifizierung zeigt, dass ca. 42 % der Mx1-positiven Strukturen ebenfalls positiv für Galectin-3 waren (siehe Abbildung 3.10 D). In einem Endozytose-Experiment wurde rekombinantes humanes Galectin-3, gekoppelt an Alexa Fluor 647 (Galectin-3-A647), auf die apikale Domäne von MDCK-Zellen gegeben und die Zellen 30 min nach Endozytosebeginn fixiert und Mx1 mittels Immunfärbung sichtbar gemacht. Man erkennt, dass Galectin-3-A647 in tubuovesikuläre Membranen internalisiert wurde, die der Struktur von Recyclingendosomen entsprechen (Lakshminarayan *et al.*, 2014, Goldenring, 2015). Die IF gegen Mx1 zeigte, dass diese große GTPase ebenfalls mit diesen Membranen assoziiert war (siehe Abbildung 3.10 B).

Zur Validierung der Koloalisationsstudien wurde für endogenes Galectin-3 und Mx1 ein PLA angeschlossen und im KLSM betrachtet. Man sieht, dass auch in MDCK-Zellen die gewählte Negativkontrolle aus  $\beta$ -Catenin und hnRNPA2B1 und die Positivkontrolle aus Kif5 und  $\alpha$ -Tubulin zum gleichen Ergebnis wie in COS-7-Zellen führten (siehe Abbildung 3.10 C). Als zusätzliche Kontrolle und um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurde im PLA noch eine Assoziation von Mx1 mit GFP bzw. Lamin A/C getestet. In Wildtyp-MDCK-Zellen wird kein GFP exprimiert, ebenfalls sollte zytosolisches Mx1 nicht mit der nukleären Lamina in nächster Nähe vorliegen. Für Mx1 und Galectin-3 konnten wie erwartet PLA-Signale detektiert werden, für Mx1 und GFP bzw. Lamin A/C hingegen nicht (siehe Abbildung 3.10 E). Im x/z-Scan wird erkennbar, dass die Assoziation von Mx1 mit Galectin-3 im apikalen Bereich polarer Epithelzellen stattfand (siehe Abbildung 3.10 C). Die Quantifizierung macht zudem deutlich, dass dort signifikant mehr PLA-Signale auftraten als im basalen Bereich der Zelle (siehe Abbildung 3.10 F). Dies geht einher mit der vorangegangenen Visualisierung der subapikalen Koloalisation mittels *Apical* TIRFM. Bei Kif5 und  $\alpha$ -Tubulin wurde ebenfalls ein signifikanter Anteil der PLA-Signale im apikalen Bereich detektiert.



### Abbildung 3.10: TIRF-Mikroskopie und PLA von Mx1 und Galectin-3

(siehe vorherige Seite) A) Mx1-GFP (grün) und endogenes Galectin-3, immungefärbt mit Alexa Fluor 546 (rot), wurden in polaren MDCK-Zellen mittels *Apical* TIRF-Mikroskopie in einem Detektionsbereich von 90 nm betrachtet. B) Rekombinantes humanes Galectin-3, gekoppelt an Alexa Fluor 647 (rot), wurde für 30 Min von der apikalen Domäne polarer MDCK-Zellen internalisiert. Die Zellen wurden danach fixiert und Mx1/Alexa Fluor 488 (grün) mittels IF visualisiert. Die Analyse erfolgte ebenfalls durch *Apical* TIRFM in einem Bereich von 90 nm. Overlay: Überlagerung von Mx1 und Galectin-3; Ausschnitt: Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Doppelt-positive Strukturen sind durch Pfeile markiert. C) PLA (grün) in polaren MDCK-Zellen mit verschiedenen Antikörperpaaren. Die Präparate wurden im KLSM in x/y- bzw. x/z-Ebene betrachtet. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken 10  $\mu\text{M}$ . D) Quantifizierung kolokalisierter Vesikel zwischen Mx1-GFP und Galectin-3 ( $n=6$ ), wie dargestellt in A), normalisiert gegen die jeweiligen Population. E) Quantifizierung des PLA wie dargestellt in C). Zusätzlich wurden die PLA-Ereignisse von der Durchführung ohne Erstantikörper (neg Ktrl) oder zwischen Mx1 und GFP bzw. Lamin A/C in die Quantifizierung mit einbezogen. Normalisiert wurde zunächst auf die PLA-Events/ $\mu\text{m}^2$  und dann auf den MW der Positivkontrolle Kif5 +  $\alpha$ -Tubulin (= 100). F) Quantifizierung der PLA-Ereignisse im apikalen oder basolateralen Bereich, normalisiert gegen die Größe der analysierten Fläche. Alle Quantifizierungen wurden mit der Software Volocity und GraphPad Prism durchgeführt, dargestellt sind MW  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.7 Interaktion mit Komponenten des Zytoskeletts

Die Grundlage für einen gerichteten intrazellulären Proteintransport wird durch das Netzwerk des Zytoskeletts geschaffen. Mikrotubuli oder Aktinfilamente formen hier die Bahnen an denen Vesikel entlang transportiert werden (Kreitzer *et al.*, 2000, Jacob *et al.*, 2003, Jaulin *et al.*, 2007). Zytoskelettelemente sind dabei nicht als ein starres Netzwerk anzusehen, sondern als ein hochdynamisches System mit ständiger Assemblierung bzw. Disassemblierung, welches im direkten Kontakt zu intrazellulären Membranen und Kompartimenten steht und diesen ihre Form gibt (Bezanilla *et al.*, 2015).

Ob und wie Mx1 in MDCK-Zellen mit dem Zytoskelett verbunden ist, sollte im Folgenden geklärt werden. Dazu wurden zunächst verschiedene IF-Analysen in polaren und unpolaren Zellen durchgeführt und im KLSM ausgewertet. Die Immunfärbung für Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin zeigte in MDCK-Zellen das dichte Mikrotubulinetzwerk und vesikuläre Mx1-positive Strukturen (siehe Abbildung 3.11 A). Im Overlay beider Kanäle findet man Mx1-enhaltende Vesikel, die mit Mikrotubuli verknüpft sind. Auch in COS-7-Zellen konnte die Bindung von Mx1 an das Zytoskelettelement gesehen werden (siehe Abbildung 3.11 B und C). Dies konnte man dort besonders gut in der Zellperipherie beobachten, wo die Dichte der Mikrotubuli abnimmt. Auch überexprimiertes Mx1-GFP wies die gleiche Assoziation mit  $\alpha$ -Tubulin in polaren und unpolaren Zellen auf (siehe Abbildung 5.3 A und B).

### Abbildung 3.11: Visualisierung von Mx1 mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten

(siehe nächste Seite) Polare MDCK-Zellen (A) oder COS-7-Zellen (B) wurden fixiert und eine IF mit Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin/Alexa Fluor 488 (grün) durchgeführt. C) zeigt Ausschnitte aus der Peripherie von COS-7-Zellen, behandelt wie in (B). MDCK-Zellen wurden mit Mx1-GFP (grün) transfiziert und nach Polarisierung eine Phalloidin-Alexa Fluor 546 Färbung (rot) angeschlossen. Sie wurden entweder auf der basolateralen Ebene (D) oder apikal (E) mikroskopiert. F) COS-7-Zellen wurden mit Mx1-GFP (grün) transfiziert und Aktin mit Phalloidin-Alexa Fluor 546 (rot) angefärbt. Alle Präparate wurden im KLSM analysiert. Overlay: Überlagerung von Mx1 mit Tubulin bzw. Aktin; Ausschnitt: Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Pfeile markieren Mx1-positive Strukturen, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken: 10  $\mu\text{M}$ .



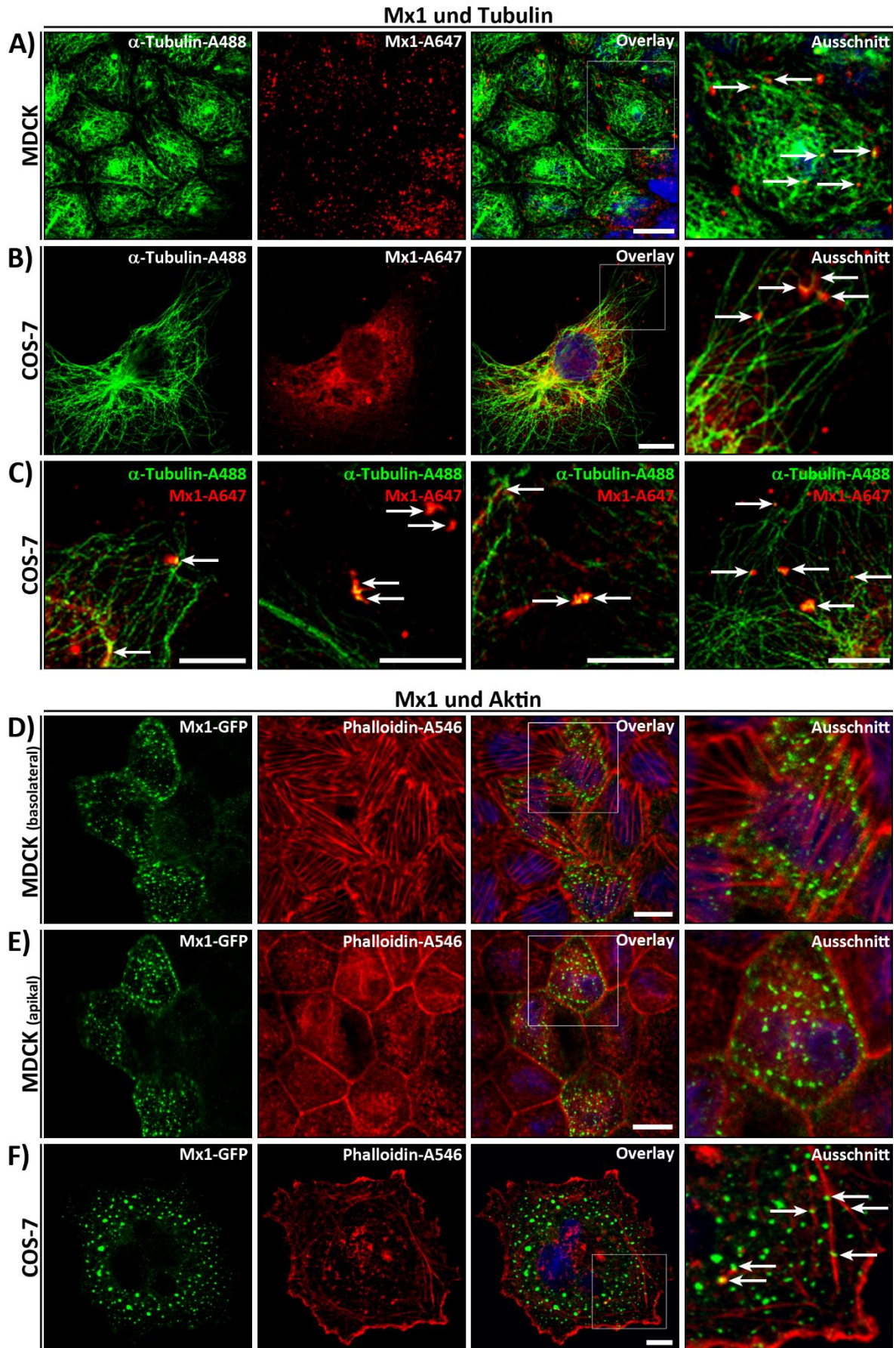
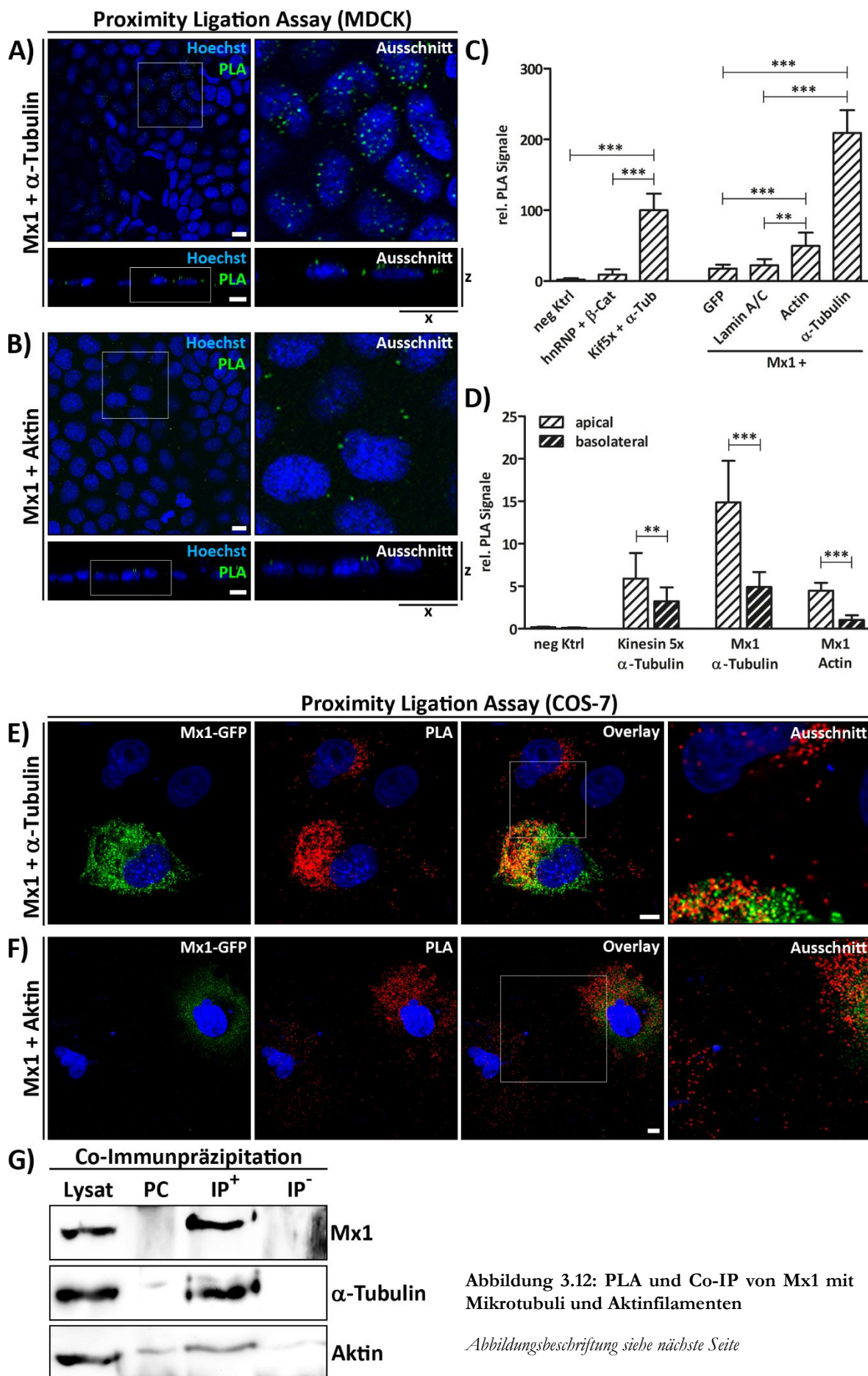


Abbildung 3.11: Visualisierung von Mx1 mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten

Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite





### Abbildung 3.12: PLA und Co-IP von Mx1 mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten

(siehe vorherige Seite) PLA in polaren MDCK-Zellen zwischen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin (A) oder Mx1 und Aktin (B). Die Präparate wurden in x/y- bzw. x/z-Ebene im KLSM analysiert. PLA-Ereignisse erscheinen in grün, Kernfärbung mit Hoechst 33342 in blau. Die Quantifizierung aller PLA-Signale (C) oder die Trennung in apikal und basolateral (D) wurde wie zuvor bei Abbildung 3.10 beschrieben durchgeführt. Daten sind repräsentiert als  $MW \pm SD$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . PLA (rot) zwischen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin (E) oder Mx1 und Aktin (F) in COS-7-Zellen, die zuvor mit Mx1-GFP (grün) transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte im KLSM. Overlay: Überlagerung von Mx1-GFP und PLA-Signalen; Ausschnitt: Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Kernfärbung mit Hoechst 33342; Größenbalken 10  $\mu$ M. G) Polare MDCK-Zellen wurden lysiert und endogenes Mx1 immunpräzipitiert. Die isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot auf die Anwesenheit von Mx1,  $\alpha$ -Tubulin und Aktin untersucht. PC: *Preclearing*; IP+: Immunpräzipitation; IP-: Negativkontrolle ohne Antikörper. In Zusammenarbeit mit K. Ringer.

In einer nächsten Analyse wurde die Verbindung zwischen Mx1 und Aktin als weitere Komponente des Zytoskeletts untersucht. Dazu wurden zuerst MDCK\_Mx1-GFP-Zellen mit dem Aktin-Farbstoff Phalloidin-Alexa Fluor 546 behandelt und im KLSM in verschiedenen z-Ebenen betrachtet. Abbildung 3.11 D zeigt die prominente Struktur der Aktin Stressfasern auf der basalen Ebene der Zellen. Man sieht, dass Mx1-GFP hier ebenfalls anwesend war, eine Beziehung zwischen Mx1-GFP und Aktin ist dort allerdings schwierig zu evaluieren. In der apikalen Region derselben Zellen bildet Aktin das terminale Netz und den *actin belt* auf Höhe der *Zonula adherens* aus. Auch dort sieht man eine deutliche Lokalisation Mx1-GFP-positiver Vesikel, wobei eine Kolokalisierung mit Aktin hier ebenso nicht eindeutig ist (siehe Abbildung 3.11 E). In unpolaren COS-7-Zellen machte die Aktin-Färbung eine Reihe von filamentösen Strukturen und den Aktin-Cortex an der Plasmamembran sichtbar (siehe Abbildung 3.10 F). Mx1-GFP-Vesikel lagen über die Zelle verteilt vor und schienen teilweise mit Aktinfilamenten verbunden zu sein.

Im engen Geflecht der Zytoskelettelemente von polaren Zellen ist es besonders schwierig eindeutige Assoziationen zu Vesikeln zu identifizieren. So auch im Fall von Mx1-GFP und Aktin. Hier macht sich der Vorteil des PLA bemerkbar, der nur direkte Assoziationen zweier Proteine anzeigt. Aus diesem Grund wurde für Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin bzw. Aktin ein PLA an die IF-Studien angeschlossen. Dieser bestätigte die gesehene Kolokalisierung zwischen Mx1 und Mikrotubuli (siehe Abbildung 3.12 A). Zudem wird durch eine x/z-Aufnahme ersichtlich, dass die Interaktion in polaren Zellen auch an der apikalen Domäne vorhanden war. Des Weiteren konnten für Mx1 und Aktin PLA-Signale detektiert werden, welche genauso im apikalen Milieu von MDCK-Zellen auftraten (siehe Abbildung 3.12 B). Die Quantifizierung der PLA-Ereignisse zeigt, dass deutlich mehr Kolokalisierung zwischen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin stattfand, als zwischen Mx1 und Aktin (siehe Abbildung 3.12 C). Trotz allem liegt das PLA-Signal für Mx1 und Aktin signifikant über den Negativkontrollen, sodass man hier von einer spezifischen Assoziation ausgehen kann. Darüber hinaus liegen die PLA-Ereignisse zwischen Mx1 und beiden Zytoskelettelementen im apikalen Bereich signifikant über den basolateralen PLA-Signalen (siehe Abbildung 3.12 D). Auch in COS-7-Zellen wurde der PLA für beide Interaktionspaare durchgeführt. Man sieht hier deutlich, dass die Interaktion zwischen Mx1 und Mikrotubuli am stärksten in einem kernnahen Bereich vorlag (siehe Abbildung 3.12 E). Die Spezifität dieser Interaktion wird dadurch untermauert, dass in Zellen, die Mx1-GFP-positiv sind, ein viel stärkeres PLA-Signal durch die Überexpression auftrat. Mx1 und Aktin lagen in dieser Zelllinie ebenfalls in nächster Nähe zueinander,

wobei die PLA-Fluoreszenz hier über die Zelle verteilt lokalisiert war. Durch die Expression von Mx1-GFP kam es gleichsam zu einer Vermehrung der PLA-Ereignisse (siehe Abbildung 3.12 F).

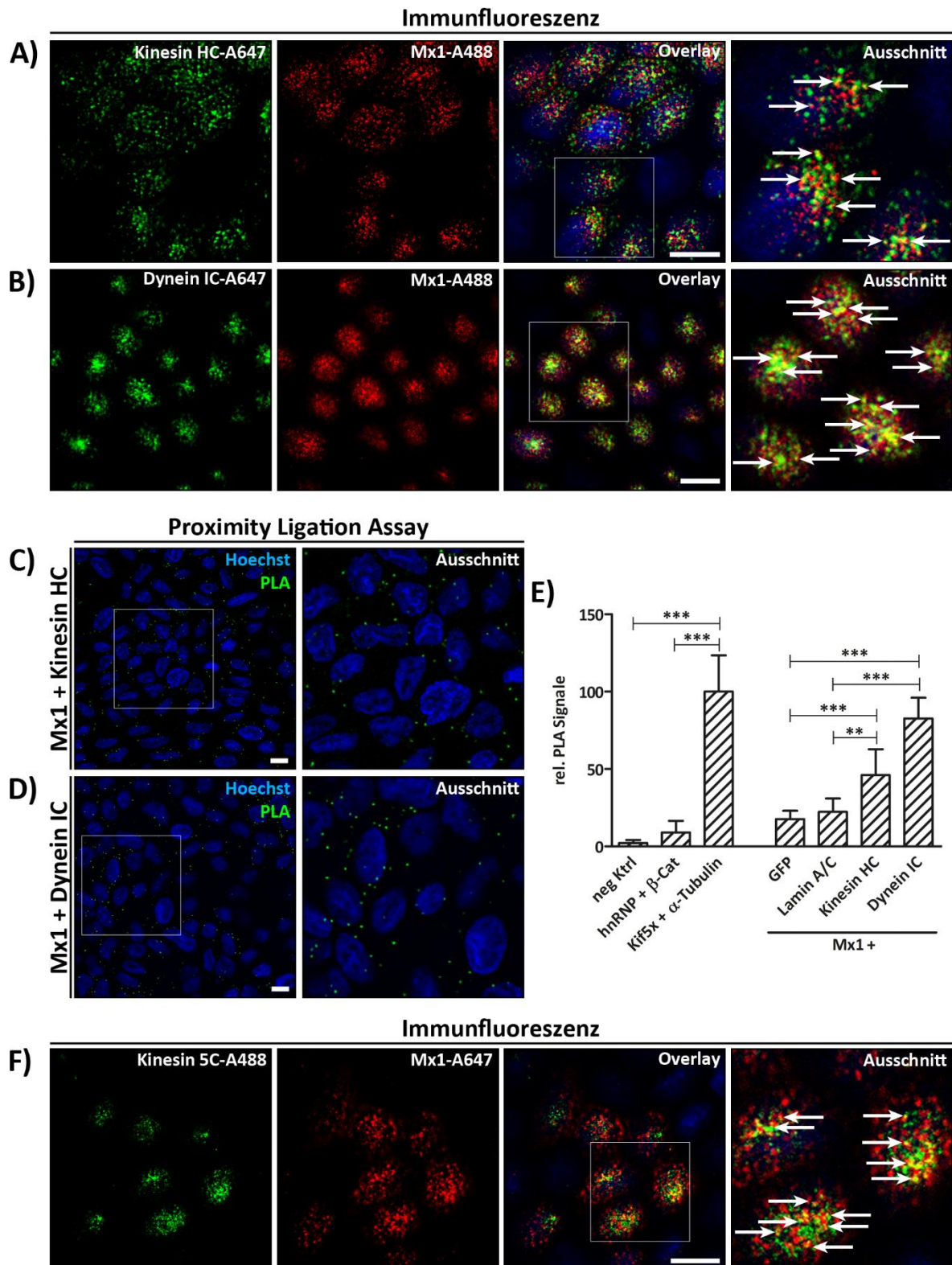
Um letztendlich herauszufinden, ob Mx1 direkt mit beiden Zytoskelettelementen interagiert, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von endogenem Mx1 aus MDCK-Zellen durchgeführt und überprüft, ob  $\alpha$ -Tubulin oder Aktin co-präzipitieren. Die drei Proteine wurden im Anschluss an eine SDS-PAGE über Immundetektion im Westernblot visualisiert. Ein an die IP vorgeschaltetes *preclearing* konnte einen geringen Teil unspezifisch bindender Proteine aus dem Lysat filtern (siehe Abbildung 3.12 G). Die IP-Probe (IP<sup>+</sup>) zeigt, dass spezifisch Mx1 präzipitiert wurde, wobei eine große Menge  $\alpha$ -Tubulin co-präzipitierte. Auch Aktin zeigte eine direkte Interaktion mit Mx1, jedoch in einem geringeren Maße als  $\alpha$ -Tubulin. Für Aktin ist auch ein schwaches Signal in der Negativkontrolle (IP<sup>-</sup>) auszumachen, doch verdeutlicht die IP, dass dieses Protein durch die Isolierung von Mx1 gezielt angereichert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die IF, der PLA und die Co-IP zur gleichen Aussage führen. Mx1 interagiert direkt mit Elementen des Zytoskeletts, wobei eine stärkere Assoziation zwischen Mx1 und Mikrotubuli zu finden ist, als zwischen Mx1 und Aktin. In polaren Epithelzellen finden diese Interaktionen überwiegend an der apikalen Domäne statt.

### 3.8 Assoziation mit Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen

Durch den hohen Grad der Assoziation von Mx1 mit Mikrotubuli und der Kolo-kalisierung mit endosomalen Kompartimenten, ist es interessant zu erfahren ob Mx1 in einem Komplex mit Transportvesikeln und Motorproteinen vorliegt. Motorproteine stellen das Bindeglied zwischen Transportvesikel und Zytoskelett dar (Vale, 1990, Vallee und Shpetner, 1990). Mit ihrer Cargodomäne binden sie ihr Transportgut und mit ihrer Motordomäne an die Proteine des Zytoskeletts. Die letztere Domäne ermöglicht unter Energieaufwendung die Bewegung des gesamten Komplexes in eine bestimmte Richtung. Diese Richtung wird hierbei durch die Klasse des Motorproteins vorgegeben. Die Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine sind Kinesin und zytoplasmatisches Dynein, wobei Kinesin vorwiegend Vesikel zum Plus-Ende und Dynein Vesikel zum Minus-Ende von Mikrotubuli transportiert. Es ist bekannt, dass Motorproteine über weitere Adapterproteine mit Rab-GTPasen interagieren und so der zielgerichtete Transport zwischen endosomalen Kompartimenten bewerkstelligt wird (Horgan und McCaffrey, 2011).

Im ersten Schritt wurden IF-Studien mit Mx1 und Kinesin bzw. Dynein durchgeführt. Da bereits aufgeklärt ist, dass Mitglieder der Kinesin-1-Familie am apikalen Transport, in polaren Epithelzellen beteiligt sind (Jaulin *et al.*, 2007, Astanina und Jacob, 2010), wurde ein Antikörper (anti-Kinesin *heavy chain*) verwendet, der alle Mitglieder dieser Kinesin-Familie erkennt. Die konfokalen Aufnahmen weisen auf eine partielle Kolo-kalisierung zwischen Kinesin *heavy chain* (Kinesin HC) und Mx1 im apikalen Bereich von polaren MDCK-Zellen hin (siehe Abbildung 3.13 A). Auch konnte Mx1 zusammen mit Dynein *intermediate chain* (Dynein IC), ein Bestandteil von zytoplasmatischem Dynein, in doppelt positiven Strukturen gesehen werden (siehe Abbildung 3.13 B).



**Abbildung 3.13: Immunfluoreszenz und PLA von Mx1 mit Motorproteinen in MDCK-Zellen**

Polare MDCK-Zellen wurden fixiert und gegen Mx1/Alexa Fluor 488 (rot) mit (A) Kinesin HC/Alexa Fluor 647 (grün) oder (B) Dynein IC/Alexa Fluor 647 (grün) immungefärbt. C+D) In polaren MDCK-Zellen wurde ein PLA (grün) zwischen Mx1 und Kinesin HC (C) oder Mx1 und Dynein IC (D) durchgeführt. E) Die PLA-Signale wurden wie zuvor bei Abbildung 3.10 beschrieben quantifiziert. Daten sind repräsentiert als MW  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . F) IF in polaren MDCK-Zellen zwischen Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) und Kif5C/Alexa Fluor 488 (grün). Der Overlay zeigt bei (A),(B) und (F) die Überlagerung von Mx1 mit den Motorproteinen. Ausschnitte vergrößern einen Bereich aus dem Overlay (siehe Kasten). Pfeile markieren kolokalisierte Strukturen. Kernfärbung mit Hoechst 33342, Größenbalken: 10  $\mu$ M. *In Zusammenarbeit mit K. Ringer.*

Um auszuschließen, dass die Kolokalisierung in der IF auf zufällige Überlagerungen zurückzuführen ist, wurde ein PLA angeschlossen. Dieser zeigte sowohl für Mx1 und Kinesin HC, als auch für Mx1 und Dynein IC spezifische Signale, sodass Mx1 mit beiden Proteinen tatsächlich in nächster Nähe vorliegen muss (siehe Abbildung 3.13 C und D). Die Quantifizierung des PLA macht deutlich, dass eine stärkere Assoziation zwischen Mx1 und Dynein IC als mit Kinesin HC bestand (siehe Abbildung 3.13 E). Kif5C, ein Mitglied der Kinesin-1-Familie, ist involviert um p75<sup>NTR</sup> an die apikale Membran in MDCK-Zellen zu befördern (Astanina und Jacob, 2010). Da Mx1 an p75<sup>NTR</sup>-positive Vesikel bindet, wurde noch in der IF überprüft, ob eine Kolokalisierung zwischen Mx1 und Kif5C existiert. Abbildung 3.13 F macht deutlich, dass Kif5C und Mx1 teilweise in denselben Strukturen lokalisiert waren.

Mx1 steht somit in Assoziation zu den Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen Dynein und der Kinesin-1-Familie, wobei Kif5C hier ein Kandidat für eine Interaktion zu sein scheint. Ob es sich hier um direkte Interaktionen handelt, konnte mittels Co-IP bislang noch nicht aufgeklärt werden.

### 3.9 Assoziation mit Dynamin-2

Mx1 ist ein Mitglied der Superfamilie der Dynamine und teilt Strukturhomologien mit den klassischen Dynaminen (Low und Lowe, 2010, Gao *et al.*, 2011). Während die Expression von Dynamin-1 auf Neuronen begrenzt ist, kommt Dynamin-2 ubiquitär vor und erfüllt wichtige Aufgaben im intrazellulären Transport (Cook *et al.*, 1994, Altschuler *et al.*, 1998). Neben der Fission von endozytotischen Vesikeln an der Plasmamembran, soll Dynamin-2 auch für die Abschnürung von exozytotischen Vesikeln am TGN verantwortlich sein (Kreitzer *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011). Nicht funktionelles Dynamin-2 soll dabei auch die Bildung von p75<sup>NTR</sup>-positiven Vesikeln am TGN gestört haben. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass rekombinantes MxA mit Dynamin aus murinen Gehirnextrakten Heterooligomere formt (Jatiani und Mittal, 2004). Ob Mx1 auch mit Dynamin-2 assoziiert ist, wurde in polaren MDCK-Zellen und unpolaren COS-7-Zellen zunächst mittels IF analysiert.

Die KLSM-Aufnahmen mit endogener Immunfärbung zeigten in MDCK-Zellen partielle Kolokalisierung für beide Proteine (siehe Abbildung 3.14 A). Ebenfalls wurde dies für überexprimiertes Mx1-GFP und endogenes Dynamin-2 gesehen (siehe Abbildung 3.14 B). In COS-7-Zellen, die mit Mx1-GFP transfiziert und in denen Dynamin-2 mittels IF sichtbar gemacht wurde, sah man deutliche Kolokalisationen in vesikulären Strukturen in einem perinukleären Bereich (siehe Abbildung 3.14 C). Des Weiteren konnte für Dynamin-2 eine klare Lokalisation an der Plasmamembran ausgemacht werden, während Mx1 dort nicht vorkam. Ein PLA in MDCK-Zellen führte zu spezifischen Signalen zwischen Mx1 und Dynamin-2, sodass man davon ausgehen kann, dass beide Proteine tatsächlich gleich lokalisiert sind (siehe Abbildung 3.14 D und E). Ein PLA in COS-7-Zellen bestätigt diese Beobachtung, wobei Mx1-GFP exprimierende Zellen deutlich mehr PLA-Ereignisse im Vergleich zu untransfizierten Zellen aufwiesen (siehe Abbildung 3.14 F). Eine direkte Interaktion konnte mittels Co-IP allerdings auch hier bislang nicht nachgewiesen, doch scheinen beide Proteine in unmittelbarer Nähe assoziiert zu sein.



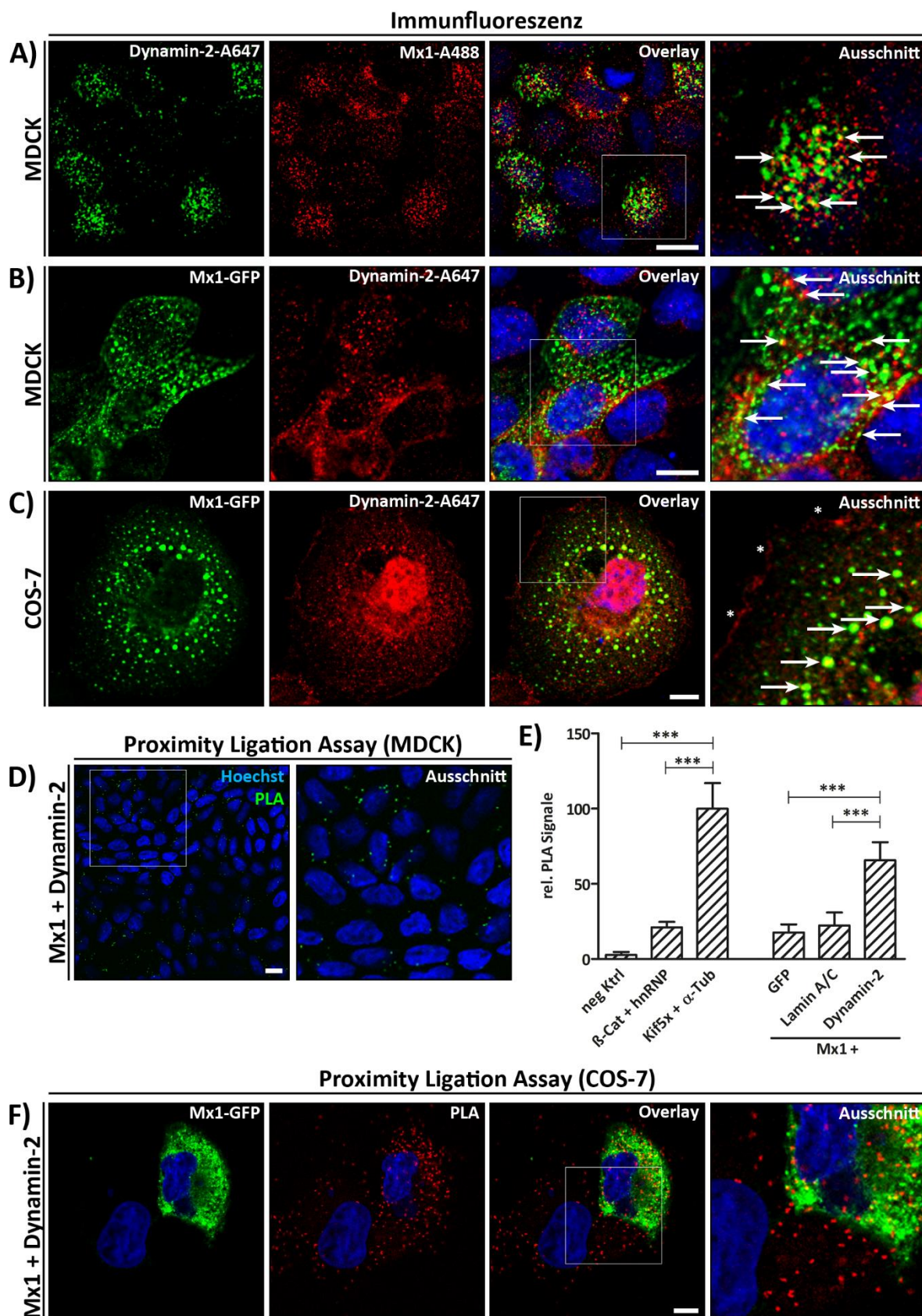


Abbildung 3.14: Immunfluoreszenz und PLA von Mx1 und Dynamin-2

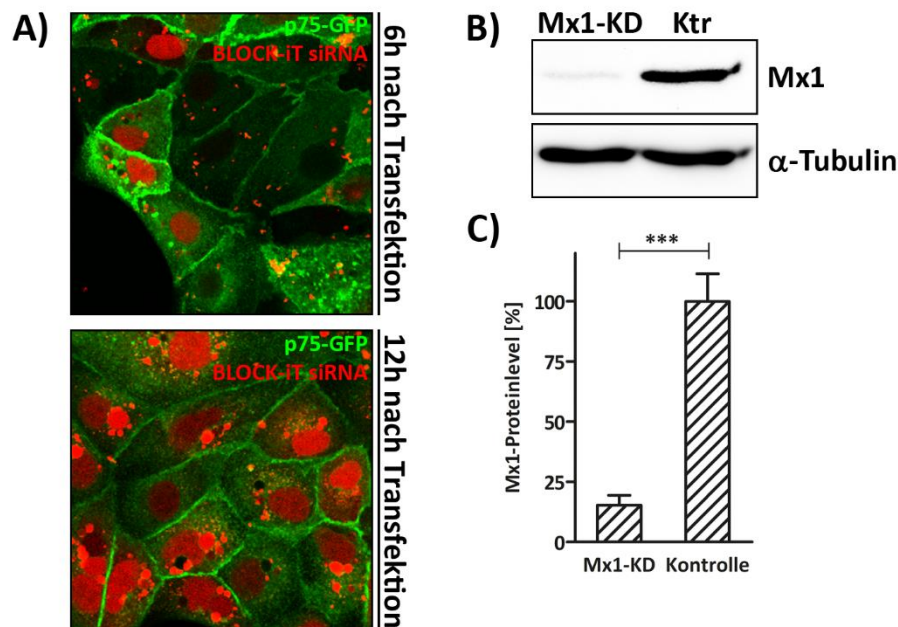
Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite

### Abbildung 3.14: Immunfluoreszenz und PLA von Mx1 und Dynamin-2

(siehe vorherige Seite) A) Polare MDCK-Zellen wurden fixiert und gegen Mx1/Alexa Fluor 488 (rot) und Dynamin-2/Alexa Fluor 647 (grün) immungefärbt. MDCK-Zellen (B) oder COS-7-Zellen (C) wurden mit Mx1-GFP (grün) transfiziert. Dynamin-2 wurde mittels Alexa Fluor 647 (rot) in einer IF visualisiert. Der Overlay zeigt die Überlagerung von Mx1 und Dynamin-2. Im Ausschnitt wird eine Vergrößerung des Overlays dargestellt (siehe Kasten). Kolokalisierte Strukturen sind mit Pfeilen markiert. Sterne weisen auf die Membranfärbung von Dynamin-2 in COS-7-Zellen hin. D) In polaren MDCK-Zellen wurde ein PLA (grün) zwischen Mx1 und Dynamin-2 durchgeführt. E) Der PLA wurde wie zuvor bei Abbildung 3.10 beschrieben quantifiziert. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . F) PLA (rot) zwischen Mx1 und Dynamin-2 in COS-7-Zellen, die vorher mit Mx1-GFP (grün) transfiziert wurden. Overlay: Überlagerung von Mx1-GFP und PLA; Ausschnitt: Vergrößerung aus dem Overlay (siehe Kasten). Alle Präparate wurden im KLSM analysiert. Kernfärbung mit Hoechst 33342, Größenbalken: 10  $\mu$ M.

### 3.10 Mx1-*knockdown* und Sekretionsstudie

Letztendlich ist es entscheidend zu erfahren, ob Mx1 eine Funktion im Transport der vesikulären Strukturen ausübt und daher die zuvor beschriebenen Beobachtungen auftreten. Um dies aufzuklären wurde die Mx1-Synthese mittels RNA-Interferenz in MDCK-Zellen herunterreguliert und verschiedene Transportstudien durchgeführt. Die spezifische siRNA wurde mittels Lipofektion in die Zellen transfiziert, die kationischen Liposomen des Transfektionsreagenz ermöglichen dabei der siRNA die Zellmembran zu überqueren (siehe Punkt 2.1.7). Die Transfektionseffizienz dieser Methode wurde zunächst mittels fluoreszierender siRNA (BLOCK-iT siRNA), die nach Aufnahme in den Kern transloziert, in MDCK\_p75-GFP-Zellen evaluiert. In Abbildung 3.15 A sieht man, dass sechs Stunden

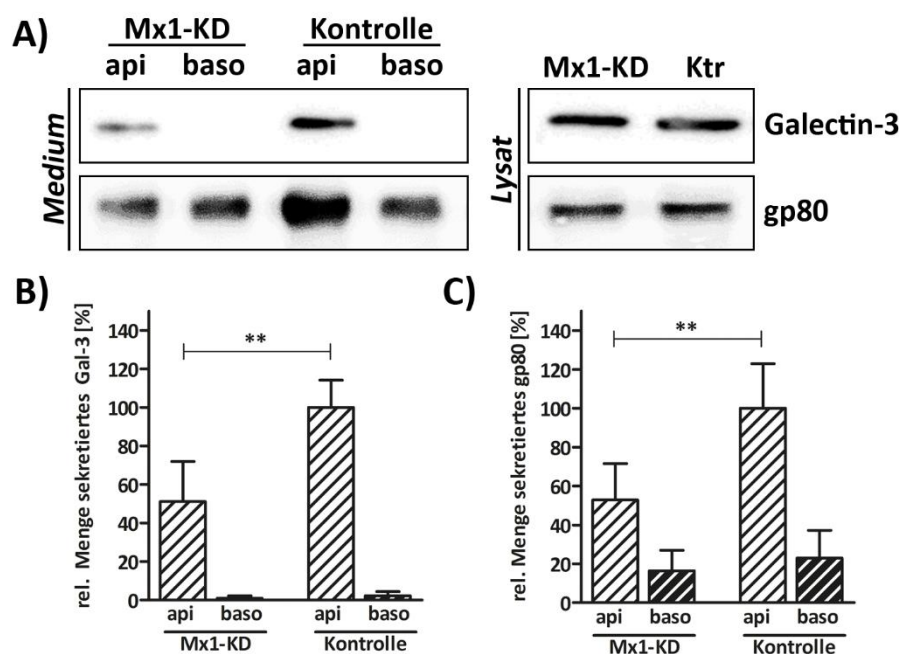


**Abbildung 3.15: siRNA-Transfektionseffizienz und Mx1-*knockdown*-Spezifität**

A) MDCK\_p75-GFP-Zellen (grün) wurden mit fluoreszierender BLOCK-iT siRNA (rot) transfiziert und die Zellen 6 bzw. 12 Stunden nach der Transfektion im KLSM betrachtet. B) MDCK\_p75-GFP-Zellen wurden mit spezifischer Mx1-siRNA transfiziert (Mx1-KD) oder kontrollbehandelt (Ktr). Die *knockdown*-Effizienz wurde nach 3 Tagen über SDS-PAGE und Westernblot evaluiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. C) Quantifizierung der Mx1-Proteinmenge im Lysat von fünf Experimenten wie in (B), normalisiert gegen  $\alpha$ -Tubulin. Zur Quantifizierung wurden *LabImage 1D* und *GraphPad Prism* verwendet. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD,  $p < 0.001$ .

nach der Transfektion freie rot-fluoreszierende siRNA-Moleküle vorlagen und bereits erste Zellen eine Kernfluoreszenz aufwiesen. Nach 12 Stunden hatten alle Zellen die siRNA in den Nukleus aufgenommen, sodass die gewählte Transfektionsmethode sich mit sehr hoher Effizienz auszeichnet. Im nachfolgenden Schritt wurde die Effizienz der synthetisierten Mx1-siRNA analysiert. Dazu wurden die Zellen nach der siRNA-Transfektion lysiert und der Mx1-Proteingehalt im Zelllysat mittels SDS-PAGE und Westernblot ausgewertet. Die siRNA gegen Mx1 führte dabei zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge auf ca. 15 % im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen (siehe Abbildung 3.15 B und C).

Um nun eine mögliche Beteiligung von Mx1 im intrazellulären Transport aufzuklären, wurde eine Sekretionsstudie mit Galectin-3 und dem Glykoprotein gp80 durchgeführt (siehe Punkt 2.2.8). Beide Proteine werden im Normalzustand vorwiegend in das apikale Medium von polaren Epithelzellen sekretiert (Parczyk und Kondor-Koch, 1989, Lindstedt *et al.*, 1993). Für diese Arbeit wurden polare MDCK-Zellen auf Filtereinsätzen kultiviert, um spezifisch das basolaterale oder apikale Medium isolieren zu können. Die Mx1-Synthese wurde mittels siRNA reduziert und die Menge von Galectin-3 bzw. gp80 im Medium beider Membrandomänen mittels SDS-PAGE und Westernblot untersucht. Im Westernblot ist zu sehen, dass in Mx1-*knockdown*-Zellen der Transport beider Proteine in das apikale Milieu gestört wurde (siehe Abbildung 3.16 A). Die Quantifizierung gegen intrazelluläres Protein zeigt, dass signifikant weniger Galectin-3 (noch ca. 51 %) bzw. gp80 (noch ca. 53 %) über die apikale Plasmamembran gelangte, wobei das Verhältnis zur basolateralen Sekretion gleich blieb (siehe Abbildung 3.16 B und C).



**Abbildung 3.16: Sekretionsstudie nach Mx1-*knockdown***

A) MDCK-Zellen wurden mit Mx1 siRNA (Mx1-KD) bzw. kontrollbehandelt und bis zu ihrer Polarität auf Filtereinsätzen kultiviert. In das apikale (api) bzw. basolaterale (baso) Medium sekretierte Komponenten wurden für 1 h gesammelt. Die Zellen wurden danach lysiert und Medium und Lysate wurden im Westernblot auf die Menge von Galectin-3 und gp80 untersucht. Die Menge von sekretiertem Galectin-3 (B) bzw. gp80 (C) ins apikale oder basolaterale Medium wurde densitometrisch quantifiziert (n=5). Die Menge der sekretierten Proteine wurde gegen die Menge im Lysat normalisiert. Zur Quantifizierung wurde *LabImage 1D* und GraphPad Prism verwendet. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD,  $p < 0.01$ .



### 3.11 Transportstudie von p75-GFP nach Mx1-*knockdown*

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob Mx1 am Transport von p75-GFP zur apikalen Plasmamembran beteiligt ist. Dazu wurden MDCK\_p75-GFP-Zellen erneut auf Filtereinsätzen kultiviert und Mx1 durch siRNA depletiert. Mittels Oberflächenbiotinylierung wurden spezifisch entweder apikale oder basolaterale Plasmamembranproteine markiert und anschließend mit NeutrAvidin Agarosebeads aus dem Lysat isoliert (siehe Punkt 2.2.7). Eine Analyse der isolierten Oberflächenproteine erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot. Vorab wurde die *knockdown*-Effizienz überprüft, wobei die Mx1-Synthese wie zuvor herab reguliert wurde (siehe Abbildung 3.17 A). Danach wurde die Distribution von einem apikalen (gp135) und einem basolateralen (CD29) Markerprotein an beiden Membrandomänen nach der Biotinylierung evaluiert (Ojakian und Schwimmer, 1988, Schoenenberger *et al.*, 1994). Man erkennt, dass in dieser Studie effektiv die beiden Membrandomänen voneinander getrennt analysiert werden konnten. So wurde gp135 fast ausschließlich apikal und CD29 vorwiegend basolateral detektiert (siehe Abbildung 3.17 B). Zytosolisches GAPDH wurde bei der Isolierung der Membranproteine nicht präzipitiert. Die densitometrische Auswertung der Westernblots zeigt, dass der Mx1-*knockdown* zu keiner signifikanten Veränderung der Menge oder der Verteilung beider Proteine an der Plasmamembran führte (siehe Abbildung 3.17 C und D). Um im nächsten Schritt gezielt einen Einfluss auf den biosynthetischen Transportweg von p75-GFP zu beleuchten, wurden neu synthetisierte Proteine durch den Einbau der radioaktiven Aminosäure [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> wird zuerst als vorläufiges Protein hergestellt und erhält nachfolgend verschiedene Glykosylierungen (Grob *et al.*, 1985). Die unglykosylierte bzw. komplex glykosylierte Form kann man durch die Gelelektrophorese als Doppelbande voneinander unterscheiden. In einem Maturierungsexperiment von radioaktiv-markiertem p75<sup>NTR</sup> sah man direkt nach der Markierung nur die unglykosylierte Form im Zelllysate vorliegen (siehe Abbildung 3.17 E). Nach zwei Stunden

#### Abbildung 3.17: Oberflächenbiotinylierung von p75-GFP nach Mx1-*knockdown*

(siehe nächste Seite) MDCK\_p75-GFP-Zellen wurden auf Filtereinsätzen kultiviert und Mx1 mittels siRNA depletiert. Nach Erreichen der Polarität wurde eine biosynthetische Markierung für 15 min mit [<sup>35</sup>S]-Methionin durchgeführt. Vor der Zellyse wurden Proteine an der apikalen bzw. basolateralen Membran biotinyliert. A) Die *knockdown*-Effizienz wurde im Westernblot gegen Mx1 überprüft.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. api: apikal; baso: basolateral. B) Die spezifische Biotinylierung der Membrandomänen wurde im Westernblot gegen gp135 oder CD29 überprüft. GAPDH diente als Negativkontrolle für eine Lysatkontamination. C) Die relative Menge von gp135 (C) (n=3) oder CD29 (D) (n=4) an beiden Membrandomänen wurde densitometrisch quantifiziert. E) MDCK\_p75-GFP-Zellen wurden verschiedene Stunden nach radioaktiv-Markierung lysiert und p75-GFP immunpräzipitiert. Die Maturierung von p75-GFP wurde nach SDS-PAGE und Analyse mittels Autoradiographie betrachtet. F) Gesamt-p75-GFP wurde mittels IP nach einem *chase* für 2 h aus dem Zelllysate isoliert, gefolgt von der Präzipitation von Oberflächen-p75-GFP durch NeutrAvidin Agarosebeads. Das restliche intrazelluläre p75-GFP wurde danach ebenfalls durch IP isoliert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. G) Die rel. Menge apikales p75-GFP, zu sehen wie in (F) wurde quantifiziert (n=3). H) Die Menge von Mx1 nach Mx1-KD, in der Rettungskondition (Mx1-KD + cMx1) und in kontrollbehandelten Zellen wurde im Westernblot gegen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin evaluiert. Die Transfektion und Expression von caninem Mx1 wurde durch die Überexpression (cMx1) verifiziert. I) Canines Mx1 (cMx1) wurde in Mx1-KD-Zellen transfiziert, um den *knockdown*-Effekt auszugleichen. Die relative Menge von p75-GFP an beiden Membrandomänen nach Mx1-KD, in der Rettungskondition und in Kontrollzellen wurde quantifiziert (n=3). P75-GFP an der Membran wurde normalisiert gegen neu synthetisiertes intrazelluläres p75-GFP. Zur Quantifizierung wurden *LabImage 1D* und *GraphPad Prism* verwendet. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD, p<0.05.

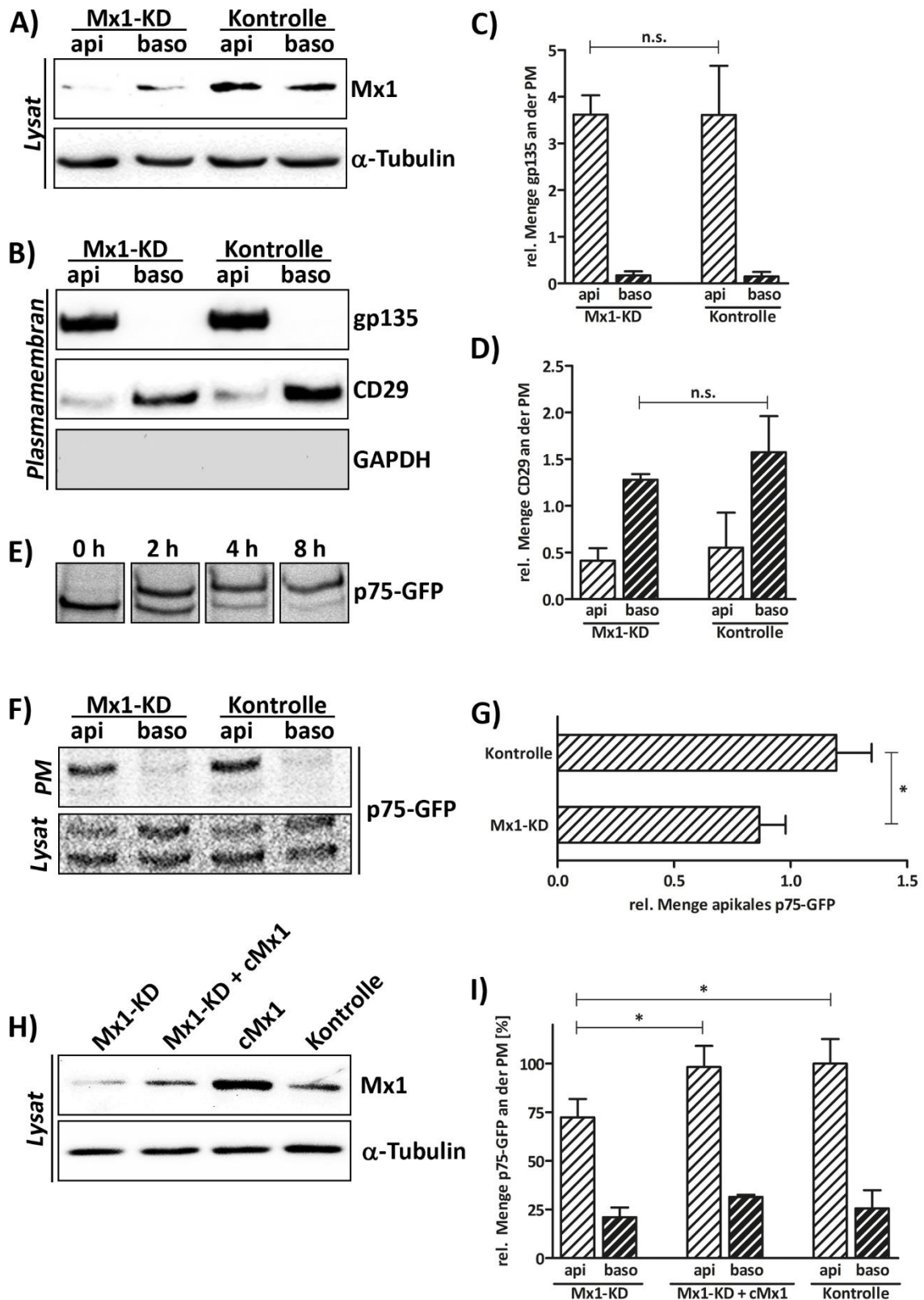
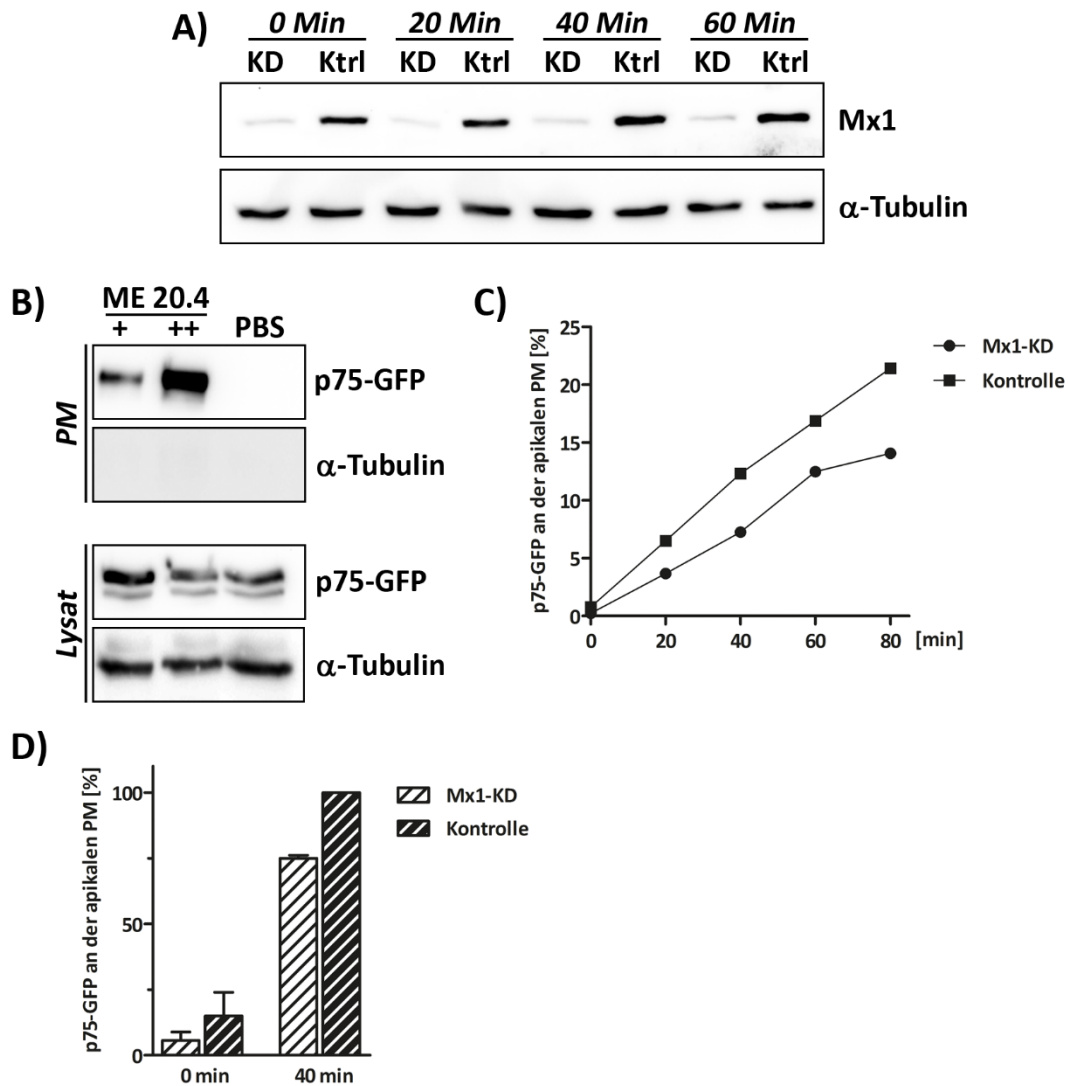


Abbildung 3.17: Oberflächenbiotinylierung von p75-GFP nach Mx1-knockdown

Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite

wurde ein großer Teil des Proteinpools komplex glykosyliert, bis 4-8 Stunden nach der Markierung fast ausschließlich die glykosylierte Form vorhanden war. In Kombination mit der Oberflächenbiotinylierung und einem Mx1-*knockdown* erkennt man, dass spezifisch nur das reife Protein an der apikalen Membran detektiert wurde, während intrazellulär beide Formen vorkamen (siehe Abbildung 3.17 F). Des Weiteren wird deutlich, dass der Mx1-*knockdown* zu ca. 30 % weniger apikalem p75-GFP führte. Die Quantifizierung gegen intrazelluläres p75-GFP zeigt, dass diese Reduktion auf signifikanten Niveau stattfand (siehe Abbildung 3.17 G). Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf anderen Ursachen als dem Mx1-*knockdown* beruhte, wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt. So sollte die exogene Expression von caninem Mx1 das Transportdefizit im Mx1-*knockdown* ausgleichen. Im Westernblot wurde vorab getestet, ob der Mx1-Proteingehalt in der Rettungskondition annähernd den kontrollbehandelten Zellen entsprach. Man sah, dass der gleichzeitige *knockdown* und die Transfektion von cMx1 zu einer mit der Kontrolle vergleichbaren Mx1-Menge führten (siehe Abbildung 3.17 H). Erweiterte man die Transportstudie nun um die Rettungskondition wurde deutlich, dass der Effekt auf den Transport von p75-GFP wirklich durch das Fehlen von Mx1 ausgelöst wurde. Das Transportdefizit konnte nämlich durch die zusätzliche Expression von cMx1 in Mx1-*knockdown*-Zellen auf das Niveau der Kontrollzellen ausgeglichen werden (siehe Abbildung 3.17 I). Darüber hinaus war ersichtlich, dass wie zuvor bei der Sekretionsstudie durch die Mx1-Reduktion keine Veränderung in der Sortierung von p75-GFP zur basolateralen Membran stattfand.

Neben der Oberflächenbiotinylierung wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, um das Transportverhalten von p75-GFP zu untersuchen. Mit Hilfe der Oberflächen-Immunpräzipitation ist es möglich gezielt p75-GFP an der apikalen Membran durch spezifische Antikörper zu markieren und anschließend im Lysat über Agarosebeads zu isolieren (siehe 2.2.6). Der verwendete Antikörper (ME 20.4) bindet dabei an die extrazelluläre Domäne von p75-GFP und kann nicht die Plasmamembran penetrieren. So war es möglich ausschließlich die komplex glykosylierte Variante des apikalen Membranproteins zu präzipitieren (siehe Abbildung 3.18 B). Je mehr Antikörper eingesetzt wurde, desto mehr Protein wurde hier isoliert. Die analysierten Oberflächen-IP-Proben waren dabei frei von der zytosolischen Fraktion, wie das Fehlen von  $\alpha$ -Tubulin demonstrierte. Im Lysat konnten dagegen beide Formen von p75-GFP und  $\alpha$ -Tubulin detektiert werden. Um einen Einblick in die Transportkinetik von radioaktiv-markiertem p75-GFP zu erhalten wurde die Oberflächen-IP verschiedene Zeitpunkte nach der biosynthetischen Markierung und einem TGN-Block /-Exit durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurde die Mx1-*knockdown*-Effizienz im Westernblot überprüft, die auf einem gleichbleibend hohen Niveau lag (siehe Abbildung 3.18 A). In Abbildung 3.18 C ist beispielhaft die Quantifizierung eines Versuches dargestellt, bei dem man sieht, dass in Mx1-KD-Zellen die Kinetik für die Ankunft von p75-GFP an der Membran reduziert war. Die Quantifizierung von mehreren Experimenten zeigt für den beispielhaft gewählten Zeitpunkt von 40 Minuten die auch zuvor in der Oberflächenbiotinylierung gesehene Reduktion von apikalem p75-GFP in Mx1-KD-Zellen.



**Abbildung 3.18: Oberflächen-Immunpräzipitation nach Mx1-knockdown**

MDCK\_p75-GFP-Zellen wurden auf Filtereinsätzen kultiviert und Mx1 mittels siRNA depletiert (Mx1-KD). Nach Erreichen der Polarität wurde eine biosynthetische Markierung für 15 min mit [ $^{35}$ S]-Methionin durchgeführt. Neu synthetisierte Proteine wurden bei 20 °C für 4 h im TGN akkumuliert. Vor der Zellyse und für unterschiedliche Zeitpunkte nach TGN-Exit, wurde p75-GFP an der apikalen Membran mit Antikörpern (ME 20.4) markiert. A) Der Mx1-knockdown wurde für jeden Zeitpunkt im Westernblot gegen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin überprüft. B) Die apikale Membran wurde mit unterschiedlichen Mengen ME 20.4 oder PBS inkubiert und die Zellen danach lysiert. Die Immunkomplexe wurden mit Agarosebeads isoliert und die Menge von p75-GFP an der Plasmamembran (PM) oder im Lysat mittels Westernblot gegen GFP oder  $\alpha$ -Tubulin evaluiert. C) Die Menge von neu synthetisiertem p75-GFP an der apikalen Domäne wurde unterschiedliche Zeitpunkte nach TGN-Exit in Mx1-KD- oder Kontrollzellen quantifiziert. Beispielhaft ist die Kinetik eines Versuchs dargestellt. D) Die Menge von neu synthetisiertem apikalen p75-GFP direkt nach TGN-Block oder 40 min nach TGN-Exit wurde im Mx1-KD oder in der Kontrolle quantifiziert (n=3). P75-GFP an der Membran wurde normalisiert gegen neu synthetisiertes intrazelluläres p75-GFP. Zur Quantifizierung wurden *LabImage 1D* und *GraphPad Prism* verwendet. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD.

### 3.12 Expression von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarität

In Immunfluoreszenzstudien mit Mx1 fiel oftmals eine heterogene Expression dieses Proteins in unterschiedlichen Bereichen des MDCK-*monolayers* auf. Nach dem Aussäen teilen sich die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz je nach Zelldichte in verschiedenen Bereichen unterschiedlich oft. Daher sind sie nicht alle im gleichen Polarisierungsstadium. Um herauszufinden, ob die Mx1-Proteinmenge im Zusammenhang zur Polarisierung der Zellen steht, wurden MDCK-Zellen an verschiedenen Tagen nach dem Aussäen lysiert und auf ihren Mx1-Proteingehalt mittels SDS-PAGE und Westernblot untersucht. In den ersten Tagen stieg der Mx1-Proteingehalt signifikant stark an, erreichte am dritten Tag sein Maximum und ging dann am Tag fünf auf das Ausgangsniveau zurück und verblieb dort (siehe Abbildung 3.19 A und B). MDCK-Zellen erreichen 5 Tage nach dem Aussäen ihre Polarität, sodass das Maximum am dritten Tag tatsächlich mit Polaritätsprozessen einhergehen könnte (Bacallao *et al.*, 1989). Im Vergleich dazu wurde die Menge von Dynamin-2 im Lysat untersucht, wobei für dieses Protein eine heterogene Mengenverteilung detektiert wurde und beide Proteinlevelmaxima nicht miteinander korrelierten.  $\alpha$ -Tubulin zeigte keine polaritätsabhängige Veränderung und wurde zur Normalisierung der Proteinmenge verwendet.

Betrachtete man die Zellen an den unterschiedlichen Tagen nach einer IF gegen Mx1 im KLSM so ließ sich der polaritätsabhängige Trend auch dort erkennen (siehe Abbildung 3.19 C). Am ersten Tag war nur eine schwache Mx1-Synthese sichtbar, am dritten Tag waren vermehrte Zellbereiche mit hoher Mx1-Menge vorhanden. Je nach dem, welchen Bildausschnitt man betrachtete, sah man am fünften Tag ebenso Bereiche mit starker Mx1-Expression (siehe Abbildung 3.19 C obere Reihe) oder einen Abfall der Mx1-Menge, passend zur biochemischen Analyse (siehe Abbildung 3.19 C untere Reihe). Da man im Mikroskop nur einen Bruchteil der Zellen betrachtet, die für die Lysatstudie verwendet wurden, waren hier am fünften Tag Zellen sichtbar, die sich nach dem Aussäen noch geteilt haben und noch nicht vollständig auspolarisiert waren. Diese waren zwar auch im Lysat vorhanden, aber durch die große Zellzahl wurden sie dort relativiert. An späteren Tagen fand man überall die gleiche Fluoreszenzintensität wie am ersten Tag vor.

In einem weiteren Experiment zur Mx1-Synthese wurden verschiedene Zelllinien lysiert und die Anwesenheit von Mx1 im Westernblot überprüft. Die Zellen wurden dabei nicht mit Interferon induziert, sondern im „Normalzustand“ verwendet. Mx1 konnte neben der schon bekannten Synthese in MDCK-Zellen auch in COS-7-Zellen im Westernblot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.20). Diese unpolare Zelllinie wurde daher auch bei diversen IF-Studien in dieser Arbeit verwendet. Ferner wurde Mx1 in humanen Epithelzellen aus dem Darm (Caco-2) und der Niere (HK-2) detektiert. In humanen Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom (HeLa) dagegen nicht. Analog zur HK-2-Zelllinie wurden Lysate von humanen Nierenpräparaten (hkidney) auf die Expression von Mx1 untersucht. Auch in diesem Gewebematerial wurde Mx1 im Westernblot detektiert. Auffällig sind die Doppelbanden im Westernblot bei HK-2 und hKidney, die durch die Expression und Synthese von zwei Mx1-Isoformen erklärt werden könnten (Ku *et al.*, 2011, Noguchi *et al.*, 2013).

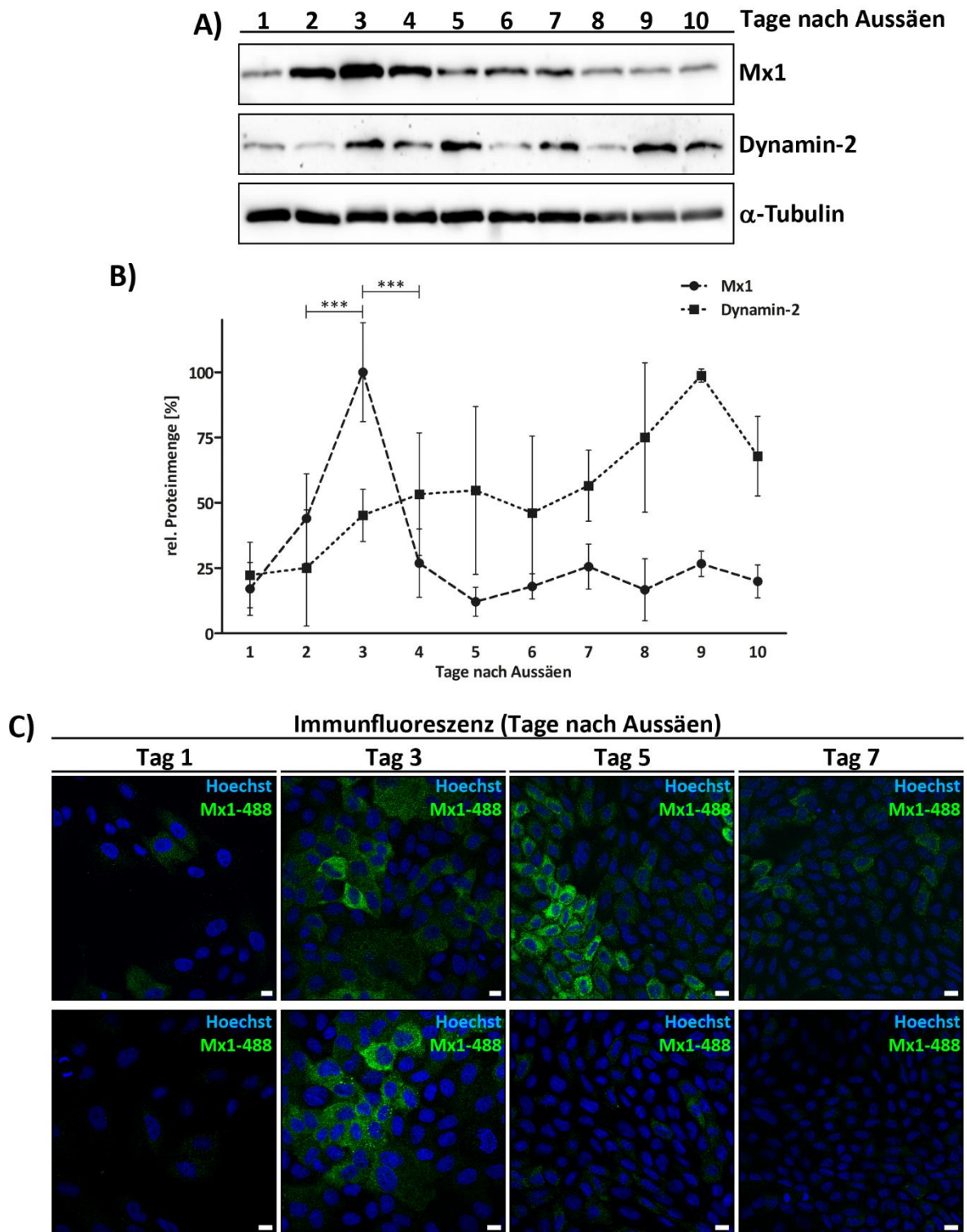
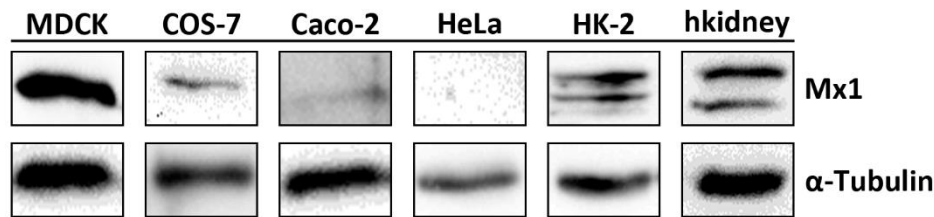


Abbildung 3.19: Expression von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarität

A) MDCK-Zellen wurden verschiedene Tage nach dem Aussäen lysiert und im Westernblot die Menge von Mx1, Dynamin-2 oder  $\alpha$ -Tubulin untersucht. B) Die relative Proteinmenge im Lysat von Mx1 (n=4) oder Dynamin-2 (n=3), normalisiert gegen  $\alpha$ -Tubulin, wurde densitometrisch quantifiziert. Zur Quantifizierung wurden *LabImage 1D* und GraphPad Prism verwendet. Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SD,  $p < 0.001$ . C) Beide Reihen: MDCK-Zellen wurden verschiedene Tage nach dem Aussäen fixiert und eine IF gegen Mx1/Alexa Fluor 488 (grün) durchgeführt. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken: 10  $\mu$ M. D) Lysate von verschiedenen Zelllinien oder humanen Nierenpräparaten (hkidney) wurden im Westernblot auf die Anwesenheit von Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin analysiert.



**Abbildung 3.20: Expression von Mx1 in verschiedenen zellulären Systemen**

Lysate von verschiedenen Zelllinien oder humanen Nierenpräparaten (hkidney) wurden im Westernblot auf die Anwesenheit von Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin analysiert.

### 3.13 Immunhistochemie von Mx1 in humanen Nierenpräparaten

Wie zuvor beschrieben, wurde die Synthese von Mx1 in einer humanen Nierenepithelzelllinie und humanem Nierengewebe nachgewiesen. Mit Hilfe der Immunhistochemie von humanen Nierenpräparaten sollte nun die Lokalisation der großen GTPase in der Niere festgestellt werden. Dies erlaubt Mx1 in einem gewebespezifischen Kontext zu betrachten, als nur wie in den vorangegangenen IF-Studien auf Zellkulturebene. Hierzu wurde Mx1 zusammen mit diversen Markerproteinen angefärbt und die Präparate im KLSM ausgewertet. MDCK-Zellen haben ihren Ursprung aus dem distalen Tubulus der caninen Niere, sodass es interessant ist zu erfahren, wo Mx1 im humanen renalen System detektiert werden kann (Herzlinger *et al.*, 1982).

Zunächst wurde Mx1 zusammen mit Galectin-3 visualisiert. Die Expression beider Proteine war in bestimmten Bereiche der Niere ausschließlich auf tubuläre Epithelzellen beschränkt, wobei sie meistens zusammen in denselben Tubuli vorlagen (siehe Abbildung 3.21 A). Darüber hinaus wurden vesikuläre Strukturen beobachtet, in denen beide Proteine stark kolokalisierten. Für Galectin-3 ist bekannt, dass es in Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohrs lokalisiert ist (Straube *et al.*, 2011), sodass die hier gefärbten Strukturen dem distalen Tubulus entsprechen könnten. Ferner wiesen Epithelzellen in manchen Tubuli eine vermehrt apikale Anwesenheit von Galectin-3 auf (siehe Abbildung 3.21 B). In diesen Zellen wurden Kolokalisierungen mit Mx1 im apikalen Bereich detektiert. Vereinzelt wurden auch Tubuli mikroskopiert, in denen Mx1 alleine vorlag. Die Expression von Galectin-3 in Zellen des Sammelrohrs wurde ebenfalls gesehen (siehe Abbildung 3.21 C). Die Co-Färbung mit Mx1 macht deutlich, dass beide Proteine im Sammelrohr exprimiert werden. E-Cadherin ist ein basolaterales

**Abbildung 3.21 Immunhistochemie von Mx1 in humanen Nierenpräparaten.**

(siehe nächste Seite) A-C) Mx1 (rot) wurde zusammen mit Galectin-3 (grün) in verschiedenen Bereiche der Niere immungefärbt. Der Overlay zeigt die Überlagerung beider Kanäle. Sterne markieren Tubuli, in denen Mx1 und Galectin-3 zusammen vorliegen. Kreuze weisen Tubuli aus, in denen Mx1 alleine exprimiert wird. Der Ausschnitt vergrößert einen Bereich aus dem Overlay (siehe Kasten). Pfeile zeigen auf kolokalisierte Strukturen. D) Mx1 (rot) wurde zusammen mit E-Cadherin (grün) mittels Antikörperfärbung visualisiert. Der Stern im Overlay markiert einen doppelt-positiven Tubulus. E-F) Mx1 (rot) und CEACAM1 (E) oder Villin (F) (grün) wurden immungefärbt. Im Overlay sind CEACAM-1- bzw. Villin-positive Tubuli mit Kreuzen markiert, Sterne weisen auf Regionen hin, in denen Mx1 exprimiert wird. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), Größenbalken: 10  $\mu$ M. Alle Präparate wurden im KLSM analysiert.



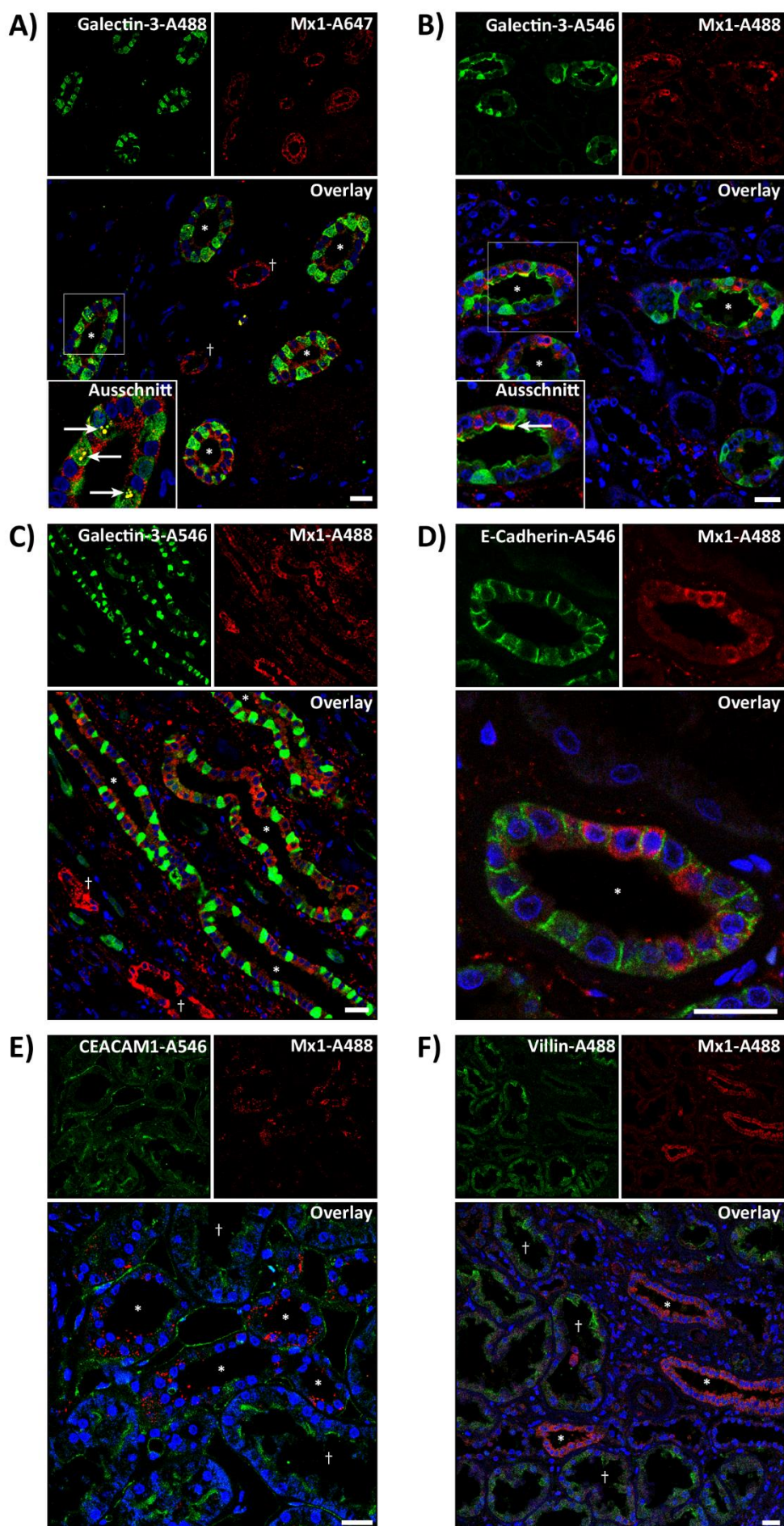


Abbildung 3.21 Immunhistochemie von Mx1 in humanen Nierenpräparaten.

Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite



Markerprotein für Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohrs, wo es zusammen mit Galectin-3 exprimiert wird (Eidelman *et al.*, 1989, Straube *et al.*, 2011). Abbildung 3.21 D zeigt einen distalen Tubulus, der doppelt positiv war für E-Cadherin und Mx1, wodurch die Expression von Mx1 im distalen Tubulus bestätigt wird. Als weitere Markerproteine wurden das Aktin-bindende Protein Villin und das Transmembranprotein CEACAM-1 angefärbt (Ocklind *et al.*, 1983, Robine *et al.*, 1985). Beide Proteine sind im apikalen Bürstensaum des proximalen Tubulus vorhanden, wobei Mx1 in diesen Tubuli nur im geringen Maße anwesend war (siehe Abbildung 3.21 E und F).

Die Westernblotanalysen und die Immunhistochemie beweisen, dass Mx1 auch im humanen System ohne künstliche Interferoninduktion in Epithelzellen synthetisiert wird. Analog zum Ursprung von MDCK-Zellen ist Mx1 in der humanen Niere zusammen mit Galectin-3 vorwiegend in Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohrs zu finden.

## 4. Diskussion

Die große GTPase Mx1 wurde in dieser Arbeit im Zusammenhang mit verschiedenen Komponenten des intrazellulären Proteintransports charakterisiert. In diesem Teil der Dissertation werden die zuvor beschriebenen Ergebnisse in einem gemeinsamen Kontext dargestellt und diskutiert.

Der Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Studien war die biochemische Identifizierung von Mx1 auf exozytotischen Transportvesikeln, die *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Plasmamembran in polaren Epithelzellen transportiert wurden (Greb, 2011). Dies war insofern eine interessante Entdeckung, da Mx-Proteine bislang in der Literatur überwiegend als Regulatoren einer antiviralen Immunantwort in Erscheinung traten und nur kaum Informationen für eine mögliche Funktion in zellulären Transportprozessen zu finden sind. Bei viralen Infektionen werden diese großen GTPasen in Folge einer Induktion durch Interferon Typ I und Typ III synthetisiert und vermitteln anschließend eine antivirale Aktivität gegen ein breites Spektrum von RNA-Viren, aber auch einige DNA-Viren (Verhelst *et al.*, 2013). Der Mechanismus der antiviralen Funktion von Mx1 ist dabei weitgehend unverstanden. Einzelne Studien zeigten aber zum Beispiel, dass MxA virale Proteine innerhalb der Zelle fehllokalisieren konnte, wodurch die Virusreplikation unterbunden wurde (Reichelt *et al.*, 2004). Des Weiteren blockierte Mx1 den endozytischen Transport von Viruspartikeln oder den Eintritt eines viralen Nukleokapsids in den Zellkern der Wirtszelle (Kochs und Haller, 1999, Palm *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen werfen mit der Entdeckung von Mx1 in Assoziation mit exozytotischen Transportvesikeln und der nun dargelegten Rolle in ihrer Beförderung die Frage auf, wie Mx1 mit intrazellulären Transportprozessen in Verbindung steht.

### 4.1 Evaluation und Bedeutung der endogenen Proteinmarkierung

Im Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurde Mx1 zusammen mit weiteren Proteinen immunologisch detektiert. Dies ist in MDCK-Zellen möglich, da Mx1 hier nicht erst nach viraler Infektion hergestellt wird, sondern konstitutiv exprimiert wird (Nakamura *et al.*, 2005). Durch die vorhandene basale Mx1-Synthese war eine Zugabe von Interferon daher nicht nötig. Dies ist insofern bedeutend, da eine Behandlung mit Interferon eine weitreichende Umprogrammierung der Zelle in einen defensiven Status mit der Aktivierung von, neben Mx1, weiteren Interferon-induzierten Proteinen zur Folge hätte. Hierunter fallen auch Proteine, die im intrazellulären Transport eine Funktion ausüben und so reguläre zelluläre Transportprozesse beeinflussen würden (de Veer *et al.*, 2001). Ebenfalls wurde gezeigt, dass durch eine Überexpression von MxA z. B. endozytotische Recyclingprozesse behindert oder Marker zellulärer Kompartimente umorganisiert wurden (Jatiani und Mittal, 2004, Stertz *et al.*, 2006). Auch die Überexpression von Transportproteinen wie z. B. der Rab-Familie, die in dieser Arbeit in IF-Studien als endosomale Markerproteine verwendet wurden, führte zu Veränderungen in der Distribution diverser Proteine (Wilcke *et al.*, 2000, Morrison *et al.*, 2008, Mottola *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch weitgehend auf die Expression von Fusionsproteinen verzichtet und

endogene Proteine visualisiert. Dies gewährleistete eine Charakterisierung in einem möglichst physiologischen Kontext.

Die zu Beginn durchgeführten Spezifitätsstudien bewiesen, dass die verwendeten Mx1-Antikörper sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch in biochemischen Experimenten gezielt die große GTPase markierten und somit keine unspezifischen Proteine betrachtet wurden. Des Weiteren wurde überprüft, ob sich das in vereinzelt Experimenten überexprimierte Mx1 anders verhält, als das endogene Protein. Die Morphologie und Lokalisation von Mx1-GFP war in MDCK-Zellen gleich zur endogenen Färbung, was auch bereits in einer vorherigen Arbeit dargelegt wurde (Greb, 2011). Darüber hinaus wurde gesehen, dass Mx1-GFP und cMx1 gemeinsam oligomerisierten, sodass eine Strukturhomologie gegeben sein muss (siehe Abbildung 3.3). Ebenfalls konnte die Transfektion von Mx1-GFP das Transportdefizit im Mx1-*knockdown* ausgleichen, was auf die Funktionalität von Mx1-GFP hinweist (siehe Abbildung 3.17). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Expression von Mx1-GFP ein funktionelles Protein hervorbringt, welches den gleichen Charakter wie sein endogenes Gegenstück aufweist.

#### 4.2 Mx1 kolokalisiert mit exozytotischen *lipid raft*-unabhängig transportierten Vesikeln

Der gerichtete Proteintransport in polaren Epithelzellen basiert auf einem hoch komplexen System von Proteinkomponenten, Lipidzusammensetzungen, zellulären Kompartimenten und dem Zytoskelett (zur Übersicht siehe Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005, Folsch *et al.*, 2009). So existieren je nach Zielort eines Proteins diverse Transportrouten mit unterschiedlichen Sortiersignalen und involvierten Adapterproteinen. Basolaterale oder apikale Cargoproteine werden nach Verlassen des TGN in distinkte endosomale Kompartimente befördert, von wo sie weiter zur jeweiligen Membrandomäne gelangen. Darüber hinaus ist bekannt, dass apikales Transportgut auf dem Weg zur Membran in verschiedene Routen aufgeteilt wird, abhängig von Signalsequenzen in der Aminosäuresequenz oder Proteinmodifikationen wie z. B. einem GPI-Anker oder Glykosylierungen. Zwei Membranproteine, die unabhängig zur apikalen Plasmamembran nach Passage des TGN gelangen, sind der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> und die Saccharase-Isomaltase (SI) (Jacob und Naim, 2001, Cramm-Behrens *et al.*, 2008, Guerriero *et al.*, 2008). Die Assoziation mit Lipidmikrodomänen, den *lipid rafts*, ermöglicht hier die Unterscheidung zwischen zwei Vesikelpopulationen: Die SI wird in Abhängigkeit zu *lipid rafts* zur apikalen Membran transportiert, während p75<sup>NTR</sup> *lipid raft*-unabhängig befördert wird. Mx1 wurde auf p75<sup>NTR</sup>-positiven Vesikeln biochemisch identifiziert, bei SI-tragenden Vesikeln konnte die große GTPase nicht detektiert werden (Greb, 2011). Mx1 scheint also gezielt mit dem *lipid raft*-unabhängigen Transportweg verbunden zu sein.

Diese Verbindung wurde in dieser Arbeit mikroskopisch näher charakterisiert. Dazu wurden MDCK-Zellen verwendet, die p75-GFP oder SI-YFP exprimieren und Mx1 nach TGN-Block/-Exit immunologisch visualisiert. Es war zu sehen, dass 10 min nach TGN-Exit Mx1 zu 47 % mit p75-GFP kolokalisierte und signifikant weniger (ca. 13 %) mit SI-YFP (siehe Abbildung 3.4). Die KLSM-Aufnahmen bestätigen daher die biochemische Interaktion, bei der ebenfalls 5-10 min nach Verlassen

des TGN die größte Mx1-Menge auf p75-GFP-positiven Vesikeln gefunden wurde. Die gemeinsame Transfektion von Mx1-GFP und p75-DsRed zeigte auch ohne TGN-Block einen substantiellen Anteil doppelt-positiver Strukturen (ca. 35 %). Zum einen wird es durch die Überexpression beider Proteine *per se* zu mehr Assoziation kommen. Die kolokalisierte Population war jedoch kleiner als bei der endogenen Färbung, was man auf den erfolgreichen TGN-Block im letzteren Fall zurückführen könnte. Des Weiteren kann ohne TGN-Akkumulation nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine Kolokalisierung zwischen Mx1-GFP und p75-DsRed, welches sich im Recyclingweg befand, beobachtet wurde. Der Neurotrophinrezeptor gelangt nach der Internalisierung von der Plasmamembran zuerst in ein Rab5-positives frühes Endosom und nachfolgend in ein Recyclingendosom positiv für Rab11 (Escudero *et al.*, 2014).

Aus diesem ist Grund ist eine wichtige Voraussetzung, um die Aussage treffen zu können, dass Mx1 im biosynthetischen Weg von p75<sup>NTR</sup> anzutreffen ist, die gezielte Analyse von exozytotischen Vesikeln. Dies sollte durch die Akkumulation neu synthetisierter Protein bei 20 °C im TGN und nachfolgendem Austritt bei 37 °C erreicht werden (Matlin und Simons, 1983). Die hohe Effizienz des TGN-Blocks wurde durch die Visualisierung des Golgi-Markers Galaktosyltransferase (GT)-DsRed zusammen mit p75<sub>SNAP</sub> sichtbar (siehe Abbildung 3.5). P75<sub>SNAP</sub> war unmittelbar nach dem TGN-Block fast ausschließlich in GT-positiven Strukturen anzutreffen. Mx1 zeigte dabei keine Assoziation mit diesem Kompartiment. Dies bestätigt, dass durch den TGN-Block gezielt exozytotische Vesikel synchronisiert werden können, auf denen Mx1 nach TGN-Austritt zu finden ist.

In diesem Experiment wurde mit Hilfe des SNAP-tags ebenfalls nur neu synthetisiertes p75<sup>NTR</sup> angefärbt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass auch p75<sup>NTR</sup> betrachtet wurde, welches sich im Recyclingweg befand. Somit wurde nicht nur die Funktion der TGN-Akkumulation bewiesen, sondern auch die gezielte Kolokalisierung von Mx1 mit neu synthetisiertem Protein. Auch hier wurde 10 min nach TGN-Exit der höchste Anteil an doppelt-positiven Strukturen detektiert, was mit vorherigen Ergebnissen der hier durchgeführten IF-Studien und der biochemischen Analyse von C. Greb einhergeht (Greb, 2011).

Die Kolokalisierung beider Proteine konnte durch einen x/z-Scan im apikalen Bereich polarer Epithelzellen verortet werden, was die Assoziation von Mx1 mit apikalen Transportvesikeln verdeutlicht. Die x/z-Aufnahme zeigt ebenfalls die vorwiegend apikale Verteilung von p75-GFP, wie es auch für dieses Protein zu erwarten wäre und die Polarität der kultivierten MDCK-Zellen wiedergibt (Yeaman *et al.*, 1997). Die durchgehende Verwendung von polaren Zellen ist wichtig, da sich das Transportverhalten in polaren und unpolaren MDCK-Zellen unterscheidet. So besitzen unpolare Zellen nur eine Population von frühen und Recycling Endosomen, wohingegen polare Zellen distinkte frühe endosomale und Recycling-Kompartimente an den unterschiedlichen Membrandomänen zu Eigen haben (Folsch *et al.*, 2009).

### 4.3 Mx1 übt eine Funktion im Transport apikaler Proteine aus

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Mx1 in MDCK-Zellen nicht nur auf exozytotischen p75<sup>NTR</sup>-positiven Transportvesikeln lokalisiert ist, sondern auch eine Rolle in ihrer Beförderung ausübt. Der Mx1-*knockdown* führte zu einer signifikanten Reduktion von p75-GFP an der apikalen Plasmamembran, wobei die Expression von Mx1-GFP den *knockdown*-Effekt ausgleichen konnte, was auf eine spezifische Funktion der großen GTPase schließen lässt.

In einem weiteren Experiment zeigte sich, dass Mx1 nicht nur den Transport eines *lipid raft*-unabhängig beförderten Membranproteins beeinflusst, sondern auch der zwei löslichen Polypeptide gp80 und Galectin-3. In Mx1-*knockdown*-Zellen reduzierte sich die sekretierte Menge beider Proteine im apikalen Medium polarer MDCK-Zellen signifikant (siehe Abbildung 3.16). Das Glykoprotein gp80 wird klassisch über den ER/Golgi-Transportweg konstitutiv ins apikale Milieu polarer MDCK-Zellen sekretiert (Parczyk und Kondor-Koch, 1989). Diese Sekretion ist abhängig vom Glykosylierungsstatus des Proteins, so verliert die Sekretion nach Entfernung der N-Glykane ihre Polarität (Parczyk und Koch-Brandt, 1991). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass die Sekretion von gp80 Mikrotubuli-abhängig abläuft (Grindstaff *et al.*, 1998). Galectin-3 wird ebenfalls ins apikale Medium polarer Epithelzellen sekretiert (Barondes *et al.*, 1994). Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings noch nicht aufgeklärt, da Galectine keine klassischen Signalsequenzen zur Sekretion enthalten.

### 4.4 Mx1 interagiert mit dynamischen intrazellulären Membranen

Nun stellt sich die Frage, an welcher Stelle im apikalen Transport von biosynthetischem p75<sup>NTR</sup> und der beiden löslichen Proteine Galectin-3 und gp80 Mx1 eine Funktion ausübt. Mx-Proteine unterscheiden sich je nach Spezies in ihrem Wirkungsort. Humanes MxA liegt zytosolisch vor, wobei murines Mx1 über ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in den Nukleus transportiert wird (Haller *et al.*, 2007). Canines Mx1 ähnelt humanem MxA und befindet sich ebenfalls im Zytoplasma der Zelle. Wie in den mikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist, liegt Mx1 jedoch nicht frei und ungebunden im Zytosol vor, sondern zeigt dort eine vesikuläre Färbung. Es ist bekannt, dass Mx1 Homooligomere in Form von Ringstrukturen mit einem Durchmesser von ~35-50 nm ausbilden kann (Accola *et al.*, 2002, von der Malsburg *et al.*, 2011). Mit Hilfe der hochauflösenden GSD-Mikroskopie wurde die endogene Mx1-Färbung an der apikalen Domäne in MDCK-Zellen untersucht. Auch hier konnten Ringstrukturen beobachtet werden, die jedoch deutlich größer (Ø: 200-400 nm) als die analysierten Oligomere waren (siehe Abbildung 3.6 A). Dynamin-1 bzw. -2 besitzen, im Gegensatz zu Mx1-Proteinen, eine PH-Domäne durch die sie an Lipidmembranen rekrutiert werden können (Haller *et al.*, 2007). Mx1 wurde in verschiedenen Studien auch ohne diese Domäne in Interaktion mit zellulären Membranen beschrieben (Accola *et al.*, 2002, Stertz *et al.*, 2006, von der Malsburg *et al.*, 2011). Wahrscheinlich wird diese Lipidbindung durch die L4-Schleife in der *stalk*-Domäne bewerkstelligt. Auch weitere Dynamin-ähnliche Proteine wie z. B. Vps1 aus *S. cerevisiae* sind in der Lage an Lipidmembranen zu binden (Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2010). Die gesehenen Ringstrukturen könnten daher Mx1, gebunden an vesikuläre

Kompartimente bzw. Transportvesikel abbilden. Tatsächlich zeigte eine Membranisolation aus MDCK-Zellen, dass ein großer Teil von Mx1 in dieser Zelllinie an Lipidmembranen rekrutiert wird (Greb, 2011).

#### 4.4.1 Evaluation der FRAP-Analyse

Die im Proteintransport involvierten zellulären Membransysteme zeichnen sich durch ihre hohe Dynamik aus. Zum einen existiert eine ständige Assemblierung bzw. Disassemblierung von Proteinkomponenten wie z. B. Mantelproteinen, Rab-Proteinen oder auch Dynaminen. Zum anderen fusionieren und teilen sich Membrankompartimente, um ihr Transportgut in der Zelle zu distribuieren.

Um die Dynamik von Mx1 zu erfassen wurde Mx1-GFP in COS-7-Zellen mit FRAP analysiert und in der Lebendzellmikroskopie beobachtet (siehe Abbildung 3.6 B und C). Die Quantifizierung der FRAP-Experimente ermittelte eine Fluoreszenzerholung mit einer schnellen initialen und einer nachfolgenden langsameren Phase. Diese Art der FRAP-Kurve wird als *diffusion-uncoupled FRAP recovery* beschrieben (Sprague und McNally, 2005). Um die Kinetik aus dieser Kurve abzuleiten, können zwei verschiedene Ausgleichsrechnungen durchgeführt werden. Die einfache Bindungsfunktion ergibt für die gesamte Fluoreszenzerholung eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 44,77 s. Eine zweifache Bindungsfunktion unterscheidet zwischen einer schnellen ( $t_{1/2, fast} = 4,57$  s) und einer langsamen ( $t_{1/2, slow} = 68,3$  s) Halbwertszeit. Die initiale rapide Fluoreszenzerholung könnte auf die Diffusion von Mx1-GFP aus dem umliegenden Zytosol in das gebleichte Areal zurückzuführen sein. Doch bei einer freien Diffusion von Molekülen im Zytoplasma sollte die Halbwertszeit nur ca. maximal 0,5 Sekunden betragen (Sprague und McNally, 2005). Die  $t_{1/2, fast}$  von Mx1-GFP ist deutlich länger, sodass hier das Betrachten der Diffusion ausgeschlossen werden kann. Durch die technische Limitierung des für die FRAP-Experimente verwendeten Setups ist auch eine Analyse der schnellen Diffusionsprozesse nahezu unmöglich. Stattdessen könnte hier zuerst eine einfache und schnelle Bindung von Mx1-GFP an das Vesikel auftreten. Danach werden weitere Moleküle rekrutiert und es kommt zur Ausbildung von Oligomeren, was eine längere Halbwertszeit und komplexere kinetische Prozesse widergeben würde.

In der Literatur wird für die meisten im Transport involvierten Proteine nicht zwischen  $t_{1/2, fast}$  bzw.  $t_{1/2, slow}$  unterschieden. Trotz Assemblierungs- und Oligomerisierungsprozessen wird die gesamte Kinetik mit einer einfachen Bindungsfunktion beschrieben. In der folgenden Tabelle sind Halbwertszeiten von verschiedenen Proteinen aus diversen Studien aufgelistet, um einen Vergleich mit  $t_{1/2} = 44,77$  s von Mx1-GFP zu ermöglichen.

Tabelle 4.1: Halbwertszeiten verschiedener Proteine in FRAP-Experimenten

Protein	Funktion	Halbwertszeit $t_{1/2}$	Literaturangabe
<b>Mx1-GFP</b>	<i>Dynamin-Protein</i>	45 s	<i>Abbildung 3.6</i>
<b>Arf1-CFP</b>	Mantelbildung	13 s	(Presley <i>et al.</i> , 2002)
<b>Clathrin-GFP</b>	Mantelprotein	16 s, 20 s	(Wu <i>et al.</i> , 2001, Puertollano <i>et al.</i> , 2003)
<b>COPI-YFP</b>	Mantelprotein	30 s	(Presley <i>et al.</i> , 2002)
<b>DRP1-YFP</b>	Dynamin-Protein	50 s	(Wasiak <i>et al.</i> , 2007)
<b>Dynamin-2-GFP</b>	Dynamin-Protein	60 s	(Thompson <i>et al.</i> , 2004)
<b>GGA1-GFP</b>	Vesikelsortierung	10 s	(Puertollano <i>et al.</i> , 2003)
<b>LAMP1-GFP</b>	lysosomale Homöostase	42 s	(Sugaya <i>et al.</i> , 2011)
<b>Rab11-GFP</b>	Vesikelsortierung	24 s	(Gidon <i>et al.</i> , 2012)
<b>Rab5-GFP</b>	Vesikelsortierung	5 s	(Vieira <i>et al.</i> , 2003)
<b>Rab7-GFP</b>	Vesikelsortierung	28 s, 52 s	(Jordens <i>et al.</i> , 2001, Sugaya <i>et al.</i> , 2011)

Die hier aufgelisteten Halbwertszeiten wurden alle unter unterschiedlichen Bedingungen erhoben, sodass ein sekundengenaue Vergleich hier nicht erfolgen kann. Auffällig ist jedoch, dass die Kinetik von Mx1-GFP in etwa in den Bereich von Dynamin-2-GFP und DRP1-YFP fällt, die wie Mx1 zur selben Proteinsuperfamilie gehören. Deutlich abgrenzen lässt sich die Mx1-GFP Kinetik von den Halbwertszeiten verschiedener Mantelproteine und teilweise auch von Rab-Proteinen, die schneller an zelluläre Membranen rekrutiert werden

In der Lebendzellbeobachtung wurden ferner Fusions- und Fissionsereignisse von Mx1-positiven Kompartimenten aufgezeichnet. Diese Beobachtungen, zusammen mit der ermittelten FRAP-Halbwertszeit beweisen, dass Mx1 ein sehr dynamisches Protein ist und seine Kinetik vergleichbar mit anderen im intrazellulären Transport involvierten Proteinen der Dynamin-Superfamilie ist.

#### 4.5 Mx1 ist im endosomalen Netzwerk lokalisiert

Um die Mx1-positiven Kompartimente näher zu charakterisieren wurde eine Reihe von IF-Studien angeschlossen. Vergleicht man die Größe der Mx1-Strukturen (200-400 nm) mit Größenangaben zu endosomalen Strukturen aus der Literatur [100-250 nm (Cataldo *et al.*, 1997), 200-500 nm (Lock und Stow, 2005), 400-800 nm (Rink *et al.*, 2005)], ist hier eine Ähnlichkeit augenscheinlich. Auch die IF zeigte, dass Mx1 in polaren Epithelzellen mit den kleinen GTPasen Rab4, -8, -11 kolokalisierte (siehe Abbildung 3.7). Diese drei Rab-Proteine wurden bereits im biosynthetischen Transportweg von LPH, die zusammen mit p75<sup>NTR</sup> *raft*-unabhängig zur apikalen Plasmamembran befördert wird, identifiziert (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Rab4 gilt zusammen mit Rab5 allgemein als Markerprotein für frühe endosomale Kompartimente, die von der Plasmamembran internalisiertes Material enthalten. Es konnte

jedoch auch gezeigt werden, dass Rab4 auf bestimmten Membrandomänen angereichert ist, die einen Transport zu apikalen Recycling Endosomen bewerkstelligen (Sonnichsen *et al.*, 2000). Ebenfalls wurde bewiesen, dass Rab4 in MDCK-Zellen am apikalen Transport des Transferrin-Rezeptors (TfR) beteiligt ist (Mohrmann *et al.*, 2002). Dieses Rab-Protein gilt somit zusammen mit Rab8 und Rab11 als Markerprotein für Recyclingendosomen, die in apikale Transportprozesse involviert sind (Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009, Goldenring, 2015). Mx1 zeigte die meiste Kolo-kalisierung mit Rab11, den Hauptregulator für Exozytose und Recycling im endosomalen System (Welz *et al.*, 2014). Ein Mitglied der Rab11-Unterfamilie ist Rab25, wobei die Expression dieser GTPase auf Lunge, Niere und den gastrointestinalen Trakt beschränkt ist (Goldenring *et al.*, 1993, Casanova *et al.*, 1999). In MDCK-Zellen kolo-kalisiert Rab25 zusammen mit Rab11 in subapikalen Vesikeln, wo es Transport und Recycling koordiniert. In dieser Arbeit zeigte Mx1 den gleichen Grad der Assoziation zu Rab25, wie zu Rab11. Dies bestärkt die Präsenz von Mx1 im apikalen Recyclingendosom, der wichtigsten Transportstation im endosomalen Sortiersystem.

Ferner wurde eine Kolo-kalisierung mit EEA1, dem Marker für frühe Endosomen, beobachtet. Eine Verbindung von Mx1 mit diesem frühen Sortierkompartiment liegt nahe, da beschrieben wurde, dass Mx1 endozytotische Prozesse beeinflusst (Jatiani und Mittal, 2004, Palm *et al.*, 2010). Dies geht auch mit der vorher beschriebenen Kolo-kalisierung mit p75-DsRed ohne TGN-Block einher, da es sich somit partiell um p75-DsRed im endozytischen Kompartiment, positiv für EEA1 und Rab5, zusammen mit Mx1 handeln könnte. Die Kolo-kalisierung mit Rab4 ist größer als mit EEA1, dies zeigt erneut, dass Rab4 hier nicht nur als Marker für frühe Endosomen gilt, sondern auch in Recyclingkompartimenten zu finden ist.

Am wenigsten lokalisierte Mx1 auf Strukturen positiv für LAMP1, einem Marker für späte Endosomen und den lysosomalen Degradierungsweg. Es wurde bereits gesehen, dass auch überexprimiertes Mx1-GFP kaum mit LAMP2 kolo-kalisierte (Greb, 2011). Dies bestätigt zum einen, dass Mx1 nicht bzw. kaum im Transport zur Proteindegredierung über Lysosomen beteiligt ist. Zum anderen sieht man auch hier, dass die Expression von Mx1-GFP sich in diesem Punkt nicht von der hier durchgeführten endogenen Analyse unterscheidet und die Transfektion von Mx1-GFP die Lokalisation des Proteins nicht zu beeinflussen scheint.

Analog zur IF-Studie in polaren MDCK-Zellen wurde ferner die Assoziation mit Rab4, -8 und -11 in unpolaren COS-7-Zellen untersucht. In dieser Zelllinie passiert die *lipid raft*-unabhängig transportierte LPH ebenfalls Endosomen, die positiv für diese drei GTPasen sind (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Auch in dieser Arbeit wurden doppelt-positive Strukturen für Mx1 mit jeweils allen drei Rab-Proteinen beobachtet (siehe Abbildung 5.2). Die Quantifizierung zeigte dort die Mehrzahl doppelt-positiver Vesikel nicht für Mx1/Rab11, sondern für Mx1/Rab4. Dies kann mit unterschiedlichen Transportwegen in polaren und unpolaren Zellsystemen zusammenhängen. So sind, wie oben bereits genannt, in polaren Zellen verschiedene apikale und basolaterale Sortierkompartimente vorhanden, während in unpolaren Zellen z. B. nur eine Population von Recyclingendosomen existiert (Brown *et al.*, 2000).



#### 4.6 Etablierung des *Proximity Ligation Assays*

In dieser Arbeit wurde der *Proximity Ligation Assay* (PLA) eingesetzt, um die IF-Kolokalisierungsstudien zu ergänzen. Der PLA visualisiert nur Bereiche in der Zelle, in denen zwei Proteine in nächster Nähe (0-40 nm) zueinander vorliegen. Er wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Transportstudien angewendet. So konnte durch den PLA gezeigt werden, dass das Influenza A Virus Hemagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) in polaren MDCK-Zellen gemeinsam in *lipid rafts* an der apikalen Membran Komplexe ausbilden (Ohkura *et al.*, 2014). Weiter wurde durch den PLA visualisiert wie die neuronale Stickstoffsynthase  $\alpha$  (nNOS $\alpha$ ) am terminalen Nervende mit dem Motorprotein Myosin Va assoziiert vorliegt (Chaudhury *et al.*, 2011). Da beim PLA wie in der IF endogene Proteine mit Antikörpern markiert werden, ist der Einsatz von spezifischen Antikörpern und geeigneter Kontrollen bedeutsam. In einem PLA-Spezifitätstest wurden in COS-7-Zellen die verwendeten Kontrollen erfolgreich evaluiert (siehe Abbildung 3.9).  $\beta$ -Catenin und das Ribonukleoprotein hnRNPA2B1 wurden dabei als Negativkontrolle verwendet.  $\beta$ -Catenin ist als Zelladhäsionsprotein in polaren Epithelzellen zusammen mit E-Cadherin in der lateralen Plasmamembran lokalisiert (Nathke *et al.*, 1994). Darüber hinaus liegt eine zytosolische Fraktion vor, die nach Aktivierung des wnt-Signalwegs in den Zellkern transloziert, sodass in diesem Kompartiment ebenso eine geringe Menge dieses Proteins vorliegt, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt (Tan *et al.*, 2012). Im Zellkern kommt es jedoch nicht zu einer Assoziation mit hnRNPA2B1, ein Protein welches *pre*-mRNA bindet, ihre zufällige Faltung verhindert und die mRNA bis zum Spleißen in ihrer nativen Form erhält (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1993). Würden beide Proteine in nächster Nähe vorliegen, würde dies durch PLA-Ereignisse im Kern zu erkennen sein. Als Positivkontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin zusammen mit Motorproteinen der Kinesin-1-Familie ausgewählt. Diese Familie besteht aus den drei Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen Kif5A, Kif5B und Kif5C (Hirokawa *et al.*, 2009). Während die Expression von Kif5A auf Neurone beschränkt ist, existieren Kif5B und Kif5C auch in anderen Zelltypen. Der hier verwendete Antikörper erkennt die schwere Kette aller Kif5-Proteine, was in Kombination mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper zu spezifischen PLA-Signalen in COS-7-Zellen führte. Dabei wurden die meisten PLA-Ereignisse in einem perinukleären Bereich registriert. Hier ist wahrscheinlich der Golgi-Apparat bzw. das TGN lokalisiert, der Ort wo Transportvesikel entstehen, die mit Hilfe von Kif5 entlang von Mikrotubuli zu ihrem Ziel befördert werden (Jaulin *et al.*, 2007, Astanina und Jacob, 2010).

Um die Spezifität der Mx1-Antikörper im PLA zu testen, wurden COS-7-Zellen zusätzlich mit Mx1-GFP transfiziert. Dies führte zu einer Verstärkung der PLA-Signale bei der Verwendung von anti-Mx1 mit anti-GFP bzw. bei zwei Mx1-Antikörpern unterschiedlicher Klonalität. Im letzteren Fall wiesen auch untransfizierte Zellen eine PLA-Fluoreszenz auf, da hier das endogene Protein markiert wurde. Dies wurde bei anti-Mx1/anti-GFP nicht gesehen, wodurch die Genauigkeit und die Aussagekraft des PLA noch einmal bekräftigt werden.

Interessant war die Beobachtung, dass es am Rande von großen Mx1-GFP-positiven Strukturen zu vermehrten PLA-Signalen kam. Dies könnte auf eine vermehrte Oligomerisierung von überexprimiertem Mx1-GFP an der Lipidmembran zurückzuführen sein und die gesehene Membranlokalisation in der GSD-Mikroskopie bestätigen.

Beim Einsatz des PLA muss man bedenken, dass ein PLA-Ereignis zwangsläufig keine direkte Interaktion bedeutet. Um genaue Aussagen treffen zu können, ob zwei Proteine miteinander interagieren und es daher zu PLA-Signalen kommt, müssen weitere Methoden wie z. B. eine Co-IP verwendet werden. Der PLA eignet sich hervorragend um IF-Studien zu unterstützen, in denen es oftmals schwierig ist zwischen echter Kolo-kalisation oder zufälliger Überlappung von zwei Proteinen zu unterscheiden. So konnte die beobachtete Kolo-kalisation in der IF mit Mx1 und Rab4, -8 und -11 in COS-7-Zellen durch den PLA bestätigt werden. Darüber hinaus stimmt dort die intrazelluläre Verteilung der PLA-Signale mit der gesehenen Kolo-kalisation überein, was die Qualität der IF-Studien verdeutlicht. Mx1 muss demnach nicht mit diesen kleinen GTPasen direkt interagieren, doch müssen sie in nächster Nähe auf der vesikulären Membran, z. B. in einem Komplex mit weiteren Proteinen, vorliegen. Damit Rab-Proteine ihrer Aufgabe in der Regulation der Vesikelbildung, des vesikulären Transports entlang des Zytoskeletts und der Fusion mit der Zielmembran nachkommen können, interagieren sie in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form, mit verschiedenen Effektorproteinen. Das Recycling von TfR zurück zur Plasmamembran ist z. B. abhängig vom Rab-Effektor Rabenosyn-5, der sowohl Rab4, als auch Rab5 an der endosomalen Membran bindet (Naslavsky *et al.*, 2004). Für Rab5 wurden bislang über 20 Effektoren beschrieben, darunter EEA1, welches für die Fusion von frühen Endosomen essentiell ist (Christoforidis und Zerial, 2000). Daher wurde EEA1 in dieser Arbeit als Markerprotein für dieses endosomale Kompartiment in der IF-Analyse eingesetzt. Rab11 interagiert ebenso mit einer Vielzahl an Effektorproteinen darunter Sec15 oder die Gruppe der Rab11 *family interacting proteins* (Rab11-FIPs). Sec15 ist Teil des Exozytiskomplexes, wodurch Rab11 seine regulatorische Funktion im exozytotischen Proteintransport ausüben könnte (Jing und Prekeris, 2009). Zu den Rab11-FIPs zählen fünf Proteine, die zusammen mit Rab11 und Rab25 auf Recycling Endosomen lokalisiert sind. Sie wirken als untergeordnete Bindepartner der Rab11-Familie und steuern das Recycling von verschiedenen Plasmamembranproteinen. In polaren Epithelzellen wurde Rab11-FIP2 im apikalen Recyclingendosom identifiziert, wo es für die Transzytose von pIgR und den apikalen Transport von Aquaporin-2 bedeutsam ist (Jing und Prekeris, 2009).

#### 4.7 Mx1 ist mit Galectin-3 assoziiert

In weiteren Kolo-kalisationsstudien konnte mit Hilfe des PLA auch eine Assoziation zwischen Mx1 und Galectin-3 in polaren Epithelzellen bewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen apikalen und basolateralen PLA-Ereignissen offenbarte, dass dabei signifikant mehr Mx1 zusammen mit Galectin-3 an der apikalen Domäne lokalisiert war.

Galectin-3 gehört zur Proteingruppe der Lektine, zuckerbindende Proteine, die mit N- oder O-Glykanen von glykosylierten Proteinen interagieren können (zur Übersicht siehe: Hönig *et al.*, 2015). P75<sup>NTR</sup> ist z. B. ein solch glykosyliertes Protein, wobei gezeigt wurde, dass die O-Glykosylierung der *stalk*-Domäne essentiell für die apikale Sortierung des Neurotrophinrezeptors ist (Yeaman *et al.*, 1997). Ferner ist die Interaktion mit Galectin-3 entscheidend für den apikalen Transport des Rezeptors. In Zellen ohne Galectin-3 wurden die *lipid raft*-unabhängig beförderten Proteine p75<sup>NTR</sup> und LPH zur basolateralen Membran fehlgeleitet, während die *lipid raft*-abhängig transportierte SI nicht beeinflusst wurde (Delacour *et al.*, 2006). Galectin-3 ist in einem *post*-Golgi endosomalen Kompartiment lokalisiert, wo es vermutlich durch Komplexbildung mit Cargoproteinen die Sortierung und Bildung von Transportvesikeln reguliert. Die Natur des Kompartiments, in dem Galectin-3 im biosynthetischen Transportweg wirkt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Biochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass 10 min nach TGN-Exit apikales Transportgut zusammen mit Galectin-3 in einem Komplex vorliegt (Delacour *et al.*, 2006, Delacour *et al.*, 2007). Eine mikroskopische Analyse in polaren MDCK-Zellen zeigte, dass Galectin-3 zusammen mit Rab11 und p75-GFP nah an der apikalen Plasmamembran kolokalisiert (Schneider *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen lassen stark vermuten, dass Galectin-3 in einem apikalen Recyclingkompartiment, positiv für Rab11, lokalisiert und dort am exozytotischen Proteintransport beteiligt ist.

Nun konnte durch den PLA gesehen werden, dass Mx1 mit Galectin-3 ebenfalls apikal kolokalisiert. Diese Kolokalisation wurde ferner mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie bestätigt (siehe Abbildung 3.10 A). Mx1-GFP zeigte eine starke Doppelfärbung mit endogenem Galectin-3 in einem Bereich von 90 nm unterhalb der apikalen Plasmamembran in polaren MDCK-Zellen. Daher ist anzunehmen, dass Mx1 zusammen mit Rab11 und Galectin-3 im apikalen Recyclingendosom assoziiert ist. Damit Galectin-3 dieses Kompartiment betreten kann, muss es zunächst durch unkonventionelle Sekretion die Zelle verlassen und über Endozytose in das Endomembransystem gelangen (Straube *et al.*, 2013, Lakshminarayan *et al.*, 2014). Erst nach Internalisierung kann das Lektin seine Aufgabe im Transport von *lipid raft*-unabhängig beförderten Proteinen ausüben. Es ist beschrieben, dass internalisiertes rekombinantes Galectin-3 30 min nach Endozytosebeginn auf neu synthetisiertes p75<sup>NTR</sup> trifft (Straube *et al.*, 2013). Zu diesem Zeitpunkt scheint Galectin-3 im Recyclingkompartiment lokalisiert zu sein. Das Endozytose-Experiment in dieser Arbeit zeigt, dass Mx1 ebenso 30 min nach Internalisierung von rekombinantem Galectin-3 mit dem Lektin in einem apikalen Kompartiment kolokalisiert, welches die für Recyclingendosomen typische tubovesikuläre Morphologie aufweist (siehe Abbildung 3.10 B).

Die endogene Galectin-3-Färbung weist mehr intrazelluläre Strukturen auf, als es beim Internalisierungs-Experiment der Fall ist. Hier wird deutlich, dass endogenes Galectin-3 nicht nur im Recyclingendosom zu finden ist, sondern auch mit anderen Kompartimenten assoziiert ist. Wie zuvor erwähnt, wird Galectin-3 unkonventionell sekretiert. Das Lektin wurde auf isolierten exosomalen Strukturen detektiert, sodass der Sekretionsprozess vermutlich über Exosomen bewerkstelligt wird (Thery *et al.*, 2001, Welton *et al.*, 2010). Wie in dieser Arbeit zu sehen ist, reduzierte der Mx1-*knockdown* die Sekretion von Galectin-3 signifikant. Mx1 wird ebenfalls unkonventionell sekretiert und wurde auf Exosomen

identifiziert (Toyokawa *et al.*, 2007a, Racicot *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass ein Mx1-*knockdown* die Sekretion von ISG15 beeinträchtigt, ein Protein das ebenfalls über einen unkonventionellen Weg die Zelle verlässt (Toyokawa *et al.*, 2007b). Der Ort der Exosomen-Biogenese sind die *Multivesicular Bodies* (MVB), wo mit Hilfe des ESCRT-Komplexes multivesikuläre Kompartimente entstehen (Colombo *et al.*, 2014). Ein Co-Faktor bei der Exosomen-Bildung ist Alix, ein Protein, das ESCRT-III an die MVB-Membran rekrutieren kann. Alix gilt daher auch als Markerprotein bei der Exosomen-Analyse. Die IF von Mx1 zusammen mit Alix zeigte in MDCK-Zellen eine Mehrzahl kolokalisierter Vesikel (siehe Abbildung 5.3). Dies lässt vermuten, dass in Abbildung 3.10 A nicht nur Mx1 und Galectin-3 in Recyclingendosomen betrachtet wird, sondern auch die Zusammenkunft beider Proteine in MVBs möglich ist und daher eine Vielzahl von Strukturen in der Färbung zu erkennen ist. Mx1 könnte somit eine Funktion in der Exosomen-Biogenese oder auch in ihrem Transport ausüben, da die Reduktion von Mx1 die Sekretion von Galectin-3 und ISG15 verminderte.

#### 4.8 Mx1 interagiert mit dem Aktin- und Tubulinzytoskelett

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Mx1 mit den Zytoskelettelementen Tubulin und Aktin sowohl mikroskopisch über IF und PLA, als auch biochemisch mittels Co-IP bewiesen. Bereits für andere Mitglieder der Mx-Proteinfamilie wurde diese Assoziation beobachtet. So bindet laut einer Co-IP-Studie humanes MxA an Mikrotubuli und Aktinfilamente in HEL-Zellen (*Human Embryonic Lung*) (Horisberger, 1992). In ovinen Drüsenepithelzellen zeigte eine massenspektrometrische Analyse von Bindungspartnern, dass Mx1 mit  $\beta$ -Tubulin interagiert, welches zusammen mit  $\alpha$ -Tubulin das Mikrotubulinetzwerk formt (Racicot *et al.*, 2012). Diese Verbindung konnte auch mittels nachfolgender Co-IP bestätigt werden. Eine direkte Interaktion ist auch für weitere Proteine der Dynamin-Superfamilie beschrieben, da murines Dynamin in neuronalem Gewebe mit Tubulin gemeinsam aufgereinigt wurde (Shpetner und Vallee, 1989). Die Interaktion zwischen Mx1 und Tubulin scheint transientser Natur zu sein, da zwar eine Anwendung des Tubulin-Inhibitors Nocodazol diese Verbindung verhindern konnte, aber die intrazelluläre Mx1 Lokalisation nach Taxol-, Colchicin- oder Nocodazolbehandlung ansonsten unverändert blieb (Horisberger, 1992, Racicot *et al.*, 2012). Welche Funktion die Bindung an Mikrotubuli bzw. Aktin haben könnte ist bislang nicht verstanden. Während in der Interphase Mx1 mit den, für den Proteintransport essentiellen, Mikrotubuli verknüpft ist, wurde ferner beobachtet wie Mx1 während der Mitose stark mit dem Spindelapparat kolokalisiert (Racicot *et al.*, 2012). Dabei ist es unklar, ob dies auf eine noch bestehende Interaktion mit Tubulin aus dem Intermitosezyklus zurückzuführen ist oder Mx1 gezielt bei der Mitose dorthin rekrutiert wird. Neue Studien bringen die Bindung an den Spindelapparat mit einer regulatorischen Rolle von Mx1 im Zellzyklus in Zusammenhang (Brown *et al.*, 2015). So zeigte sich, dass eine verminderte Mx1-Expression mit der Proliferation von Prostatakrebs korrelierte und die Metastasierung verstärkte. Ebenfalls waren Zellen mit geringer Mx1-Expression weniger sensitiv gegenüber Chemotherapeutika, die über eine Tubulindestabilisierung und dadurch induziertem Zellzyklusarrest Apoptose einleiten sollen.

Die Interaktion mit dem Zytoskelett beruht daher vermutlich auf mehreren funktionellen Gründen. Im Hinblick auf die vesikuläre Lokalisation und endosomale Assoziation von Mx1 könnte die Zytoskelettbindung auch die Ursache für eine Rolle im Proteintransport sein. Es wurde gezeigt, dass *post*-Golgi Vesikel entlang des Mikrotubulinnetzwerks zur apikalen Membran befördert werden (Kreitzer *et al.*, 2000, Jacob *et al.*, 2003, Jaulin *et al.*, 2007, Astanina und Jacob, 2010). Am Beispiel von p75<sup>NTR</sup> wurde beschrieben, wie Vesikel positiv für den Neurotrophinrezeptor zunächst Mikrotubuli-abhängig zum endosomalen Netzwerk geleitet werden, für einen endgültigen Transport an die Plasmamembran aber zusätzlich das Aktinnetzwerk und damit assoziierte Proteine entscheidend sind (Lapierre *et al.*, 2001). Die Beteiligung des Aktinnetzwerks im Kontext zum intrazellulären Transport ist bislang hauptsächlich in der Endozytose sehr gut charakterisiert. Eine weitere Rolle von Aktinfilamenten konnte jedoch auch beim Austritt von p75<sup>NTR</sup> aus dem TGN beschrieben werden (Salvarezza *et al.*, 2009). Die Aktin-bindenden Proteine LIM Kinase-1 (LIMK1) und Cofilin organisieren eine Aktinpopulation am TGN, die durch Interaktion mit der Lipidmembran und weiteren Proteinen die Bildung von p75<sup>NTR</sup>-positiven Transportvesikeln fördern.

Die bereits genannten Effekte von Mx1 auf die Lokalisation von Virusproteinen, die in der Zelle fehlgeleitet werden, die Störung von Recyclingwegen oder die hier gesehenen Transportdefekte könnten mit der Bindung an das Zytoskelett verknüpft sein. Die Quantifizierung des PLA zeigt, dass mehr Interaktionen zwischen Mx1 und Tubulin, als zwischen Mx1 und Aktin vorhanden sind (siehe Abbildung 3.12 C). Dies könnte auf eine wichtige Rolle von Mx1 beim Mikrotubuli-basierten Transport hindeuten. In polaren Zellen fanden diese Assoziationen vorwiegend im apikalen Bereich statt, was somit auch mit einer Funktion im apikalen Proteintransport einhergehen würde. In unpolaren COS-7-Zellen kolokalisieren Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin vermehrt in einem perinukleären Bereich, ähnlich zum Kif5-Motorprotein und  $\alpha$ -Tubulin. Mx1 könnte demnach auch hier beim Transport von Vesikeln, die das TGN verlassen haben und in die Peripherie befördert werden, involviert sein. Die Kolokalisierung mit Aktin konnte in der zellulären Peripherie ausgemacht werden, sodass Mx1 eventuell hier am Aktin-abhängigen Transport unterhalb der Plasmamembran beteiligt sein könnte. Die Expression von Mx1-GFP in COS-7-Zellen verstärkte die PLA-Fluoreszenz, was auf eine spezifische Interaktion schließen lässt (siehe Abbildung 3.11).

#### 4.9 Mx1 ist mit Kif5 und Dynein assoziiert

Die Frage ist, wie die Assoziation von Mx1 mit Transportvesikeln und die Bindung an Zytoskelettelemente verknüpft sein könnten. Als Bindeglied zwischen Mikrotubuli bzw. Aktinfilamenten und Vesikeln gelten die Motorproteine. Die aus mehreren Untereinheiten bestehenden großen Proteinkomplexe, können unter Energieaufwand ihr Transportgut entlang des Zytoskeletts durch die Zelle befördern. Zu den Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen gehören Kinesin und zytoplasmatisches Dynein (Vale, 1990, Vallee und Shpetner, 1990). Der Transport entlang von Aktinfilamenten wird durch Myosine bewerkstelligt (Ross *et al.*, 2008). Da Mx1 am meisten mit Tubulin interagiert, wurde untersucht, ob die große GTPase mit Kinesin und Dynein in Verbindung steht. Diese

beiden Motorproteinfamilien weisen einen unidirektionalen Bewegungsablauf auf. Sie sind gebunden an die Polarität der Mikrotubuli und können diese nur in eine Richtung begehen. Kinesin gilt generell als Plus-Ende-Motorprotein, wobei auch Kinesine ermittelt wurden, die dem Minus-Ende zugewandt funktionieren (Noda *et al.*, 2001, Hirokawa *et al.*, 2009). Bei Dyneinen wurden bislang ausschließlich Minus-Ende-Motorproteine entdeckt (King, 2000). Im allgemeinen Verständnis der zellulären Mikrotubuli-Organisation strahlen diese Zytoskelett-Elemente vom *Microtubule-organizing Center* (MTOC) in die zelluläre Peripherie aus. Das Minus-Ende ist dabei zum MTOC orientiert und das Plus-Ende befindet sich an der Plasmamembran. Dies trifft auch für die meisten unpolaren Zelltypen zu, doch in polaren Epithelzellen existiert eine weitere Mikrotubulipopulation, die parallel zur lateralen Membran angeordnet ist. Ihr Minus-Ende ist der apikalen Domäne und das Plus-Ende der basalen Seite zugewandt (Bacallao *et al.*, 1989). Es wurden verschiedene Motorproteine beschrieben, die an apikalen Transportprozessen entlang beider Mikrotubulipopulationen beteiligt sind (zur Übersicht siehe Weisz und Rodriguez-Boulán, 2009). Zum Beispiel wird Dynein für die apikale Beförderung von Rhodopsin in MDCK-Zellen benötigt (Tai *et al.*, 1999). Des Weiteren transportiert das zum Minus-Ende orientierte KIFC3 Influenza HA und Annexin XIIIb ebenfalls zur apikalen Plasmamembran (Noda *et al.*, 2001). Im Transportweg von p75<sup>NTR</sup> identifizierte man Motorproteine der Kinesin-1-Familie, die wie zuvor geschildert aus drei Mitgliedern (Kif5A, -B und -C) besteht. Kif5B und Kif5C können beide p75<sup>NTR</sup>-tragende Vesikel in Richtung Plus-Ende der Mikrotubuli befördern, wobei Kif5C in frühen Transportprozessen nach Verlassen des TGN wirkt (Jaulin *et al.*, 2007, Astanina und Jacob, 2010). *knockdown*-Experimente zeigten, dass beide Motorproteine wahrscheinlich redundant im Transport arbeiten.

In dieser Arbeit wurde die Assoziation von Mx1 mit Kif5-Motorproteinen und zytoplasmatischem Dynein mittels IF und PLA analysiert. Im KLSM waren für Mx1 und Kif5 bzw. Dynein doppelt-positive vesikuläre Strukturen in der subapikalen Region von polaren MDCK-Zellen zu erkennen. Die Kolo-kalisierung wurde ferner im PLA bestätigt, wobei die Quantifizierung zeigte, dass Mx1 mehr mit Dynein zusammen vorliegt, als mit Kinesin. Diese Beobachtung könnte die Beteiligung von Mx1 an verschiedenen Transportprozessen widerspiegeln. Die Assoziation mit Kif5 kann einer Rolle im exozytotischen Transport einer p75<sup>NTR</sup>-positiven Vesikelpopulation entsprechen. Die Verbindung zu Dynein kann auf mehreren Gründen beruhen. Zum einen könnte Mx1 auch im retrograden Transport zu finden sein, der in dieser Arbeit aber nicht beleuchtet wird. Des Weiteren gibt es, wie oben genannt, apikale Dynein-Motoren, sodass Mx1 nicht nur im Kif5-vermittelten, *lipid raft*-unabhängigen apikalen Transportweg wirken könnte. Interessanterweise wurde Dynein auch als Motorprotein beschrieben, welches Transportprozesse im endosomalen System bewerkstelligt. Hierzu zählt der Transport an Rab4- und Rab11-positiven Recyclingendosomen, welcher mit Dynein verknüpft ist (Horgan und McCaffrey, 2011).



Die Frage, wie Mx1 mit den Motorproteinen in Bezug steht, bleibt allerdings offen. Direkte Interaktionen konnten z. B. über Co-IP-Studien in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Rab-GTPasen üben eine zentrale Position in der Regulation und Bindung von Motorproteinen und Transportvesikeln aus. Durch die Spezifität für eine Interaktion mit einem bestimmten Motorprotein können Rab-Proteine einen gerichteten Transport zu einem bestimmten Zielkompartiment koordinieren. Es gibt bestätigte direkte Verbindungen von Rab-Proteinen mit Kinesinen und Dynamin, doch werden bei den meisten Transportereignissen weitere Adaptorproteine benötigt, um einen Proteinkomplex auszubilden (Bielli *et al.*, 2001, Ueno *et al.*, 2011). Zum Beispiel interagiert Rab11 mit Kif5 über das Adaptorprotein FIP3 oder mit Kif3B über FIP5 (Schonteich *et al.*, 2008, Simon und Prekeris, 2008). FIP3 erlaubt auch die oben beschriebene Verbindung von Rab11 mit Dynein (Horgan *et al.*, 2010). Man geht davon aus, dass noch viele Proteinkomponenten in den verschiedenen Transportkomplexen bislang nicht identifiziert sind. Hier wäre eine mögliche Funktion von Mx1 denkbar, welches durch seine Lipidbindung in einem Komplex mit endosomalen Vesikeln und Transportproteinen vorliegen könnte. Ein Nachweis dieser Komplexe durch Isolation und ihrer Charakterisierung bleibt natürlich an dieser Stelle offen. Ebenfalls bleibt unklar, warum in diesem Fall eine direkte Interaktion zwischen Mx1 und Tubulin bzw. Aktin detektiert werden konnte. Eventuell sind hier noch weitere Proteine zwischengeschaltet, die in dieser Arbeit nicht aufgeklärt wurden.

#### 4.10 Mx1 kolokalisiert mit Dynamin-2

Eine Assoziation von Mx1 mit Dynamin-2 wurde ebenfalls untersucht. Die IF-Studie zeigte eine Kolokalisation beider Proteine in polaren Epithelzellen (siehe Abbildung 3.14 A und B). Des Weiteren war die Doppelfärbung ebenso in COS-7-Zellen deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 3.14 C). Ferner wurde in beiden Zelltypen die enge räumliche Verbindung auch durch einen PLA bestätigt (siehe Abbildung 3.14 D-F). Dynamin-2 ist ein wichtiger Faktor bei der Vesikelbiogenese an der Plasmamembran bei endozytotischen oder am TGN bei exozytotischen Prozessen (Cook *et al.*, 1994, Altschuler *et al.*, 1998, Kreitzer *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011). Die große GTPase übt ihre Funktion zu einem späten Zeitpunkt bei der Entstehung von Clathrin-umhüllten Vesikeln aus. Dynamine binden über ihre PR-Domäne an SH3-Domänen weiterer Interaktionspartner, was zur Abschnürung der Vesikel von der Donormembran führt. Zwei wichtige Dynamin-bindende Proteine sind Amphiphysin und Endophilin. Amphiphysin interagiert sowohl mit  $\alpha$ -Adaptin als auch mit Clathrin, den zwei mantelbildenden Proteinen der Vesikelhülle. Endophilin erkennt über seine Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)-Domäne die durch die Mantelproteine induzierte Membrankrümmung und lagert sich zwischen Donormembran und Vesikel an. Dies führt zur Rekrutierung von Dynamin, was sich nun ebenfalls am Vesikelursprung anlagert und dort oligomerisiert (Altschuler *et al.*, 1998). Der eigentliche Prozess der zur Abschnürung des Vesikels führt ist noch nicht vollständig verstanden. Es existieren zwei Modelle, wobei im ersten davon ausgegangen wird, dass durch Nukleotidhydrolyse der großen GTPase eine Konformationsänderung einhergeht, die eine Vesikelfission zur Folge hat. Ein anderes Modell beschreibt, dass die Rekrutierung von Dynamin an die Membran alleine ausreicht, um diese soweit zu

verformen, dass sich das Vesikel ablöst (Low und Lowe, 2010). Der GTPase-Zyklus ist in diesem Modell an die Assemblierung bzw. Disassemblierung von Dynamin an die Lipidmembran notwendig.

Mutationsexperimente konnten zeigen, dass Dynamin wie allgemein angenommen nicht nur an der klassischen Biogenese von Clathrin-umhüllten Vesikeln beteiligt ist. Mutiertes Dynamin-2 behinderte die *lipid raft*-abhängige Endozytose von Cholera Toxin oder auch die Clathrin-unabhängige Internalisierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Liu *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist Dynamin-2 an der Entstehung von Transportvesikeln, die positiv für p75<sup>NTR</sup> sind, am TGN involviert (Kreitzer *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011). Dabei zeigte die Quantifizierung des p75<sup>NTR</sup>-Transportdefekts, dass durch einen kompletten Dynamin-2-*knockout* eine Reduktion von p75<sup>NTR</sup> an der Plasmamembran um 50 % erreicht wurde. Dies lässt weitere Faktoren an der Entstehung von Transportvesikeln vermuten, wie z. B. andere Mitglieder der Dynamin-Superfamilie.

Proteine dieser Familie üben in vielen membranmodellierenden Prozessen eine Funktion aus (zur Übersicht siehe Williams und Kim, 2014). So existieren in *S. cerevisiae* die Dynamin-ähnliche GTPasen Dnm1 oder Mgm1, die in Mitochondrien lokalisiert sind und dort Fission und Fusion regulieren. Eine weitere sehr gut charakterisierte Dynamin-ähnliche GTPase in der Hefe ist Vps1. Dieses Protein ist an vielen zellulären Prozessen wie z. B. am Proteintransport vom Golgi ins endosomale Netzwerk, an der Fission und Fusion der Vakuole oder der Teilung von Peroxisomen beteiligt. Eine weitere Rolle konnte Vps1 in der Endozytose zugeschrieben werden. Es wurde gesehen, dass diese GTPase mit Sla1 interagiert, ein Adapterprotein der Endozytose welches an Aktin und Clathrin bindet (Yu und Cai, 2004). Ohne Vps1 kann Sla1 nicht an entstehende Vesikel rekrutiert werden. Vps1 oligomerisiert ebenfalls wie Dynamin und Mx1 an Liposomen und ist in der Lage diese GTP-abhängig zu tubulieren (Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2010). Eine interessante Entdeckung ist auch, dass Vps1 mit dem Hefe Amphiphysin Rvs167 interagiert, analog zu Dynamin in Säugetieren (Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2012). In Säugetieren existiert die Dynamin-ähnliche GTPase Dlp1, welche auch eine Rolle in der mitochondrialen Fission spielt, darüber hinaus aber auch im sekretorischen Transport wirkt (Bonekamp *et al.*, 2010). Eine Dlp1-Reduktion führte zur Akkumulation von YFP-Glycan-GPI, welches *lipid raft*-abhängig zur apikalen Plasmamembran in polaren Epithelzellen befördert wird. Für dieses Dynamin-ähnliche Protein wurde wie für Mx1, Dynamin und Vps1 die Bindung an Liposomen und ihre Tubulierung beobachtet, ebenfalls ohne entsprechende PH-Domäne zur Lipidbindung (Yoon *et al.*, 2001).

#### 4.11 Wirkt Mx1 als Fissionskomponente im intrazellulären Transport?

Diese Studien und die hier beobachtete Rolle im apikalen Transport lassen auch die These einer möglichen Funktion von Mx1 in Form eines Membranmodellierungsfaktors zu. Mx1 kann wie klassisches Dynamin an zelluläre Membranen binden, an ihnen oligomerisieren und sie tubulieren (Accola *et al.*, 2002). Die hier beobachtete Lokalisierung im endosomalen Netzwerk könnte mit einer Position als Pinchase einhergehen. Die Abknospung von Transportvesikeln im endosomalen Netzwerk ist bislang nicht ausreichend studiert worden. Unter anderem wird davon ausgegangen, dass eine Komplexbildung z. B. im Fall von Galectin-3 mit Membranproteinen wie p75<sup>NTR</sup> für eine

Membrankrümmung und Vesikelbildung verantwortlich sein könnte (Lakshminarayan *et al.*, 2014). Mx1 könnte durch die Anlagerung an die Membran die Fission der Vesikel auslösen. Ob weitere Proteine daran beteiligt sind, wie z. B. Amphiphysin bei Vps1 oder bei Dynamin ist an dieser Stelle offen. Eine Membrankrümmung könnte durch ein Protein mit einer BAR-Domäne erkannt werden und Mx1 an diese Stelle rekrutiert werden. Die direkte Interaktion mit dem Zytoskelett kann die Abschnürung der Vesikel unterstützen, wie im Fall von LIMK1 und Cofilin (Salvarezza *et al.*, 2009). Die gesehene Kolokalisierung mit Motorproteinen und die Assoziation mit Transportvesikeln können darauf zurückzuführen sein, dass Mx1 nach der Abschnürung noch auf den Vesikeln verbleibt bis eine erneute Fusion mit anderen Membranen stattgefunden hat. Die Theorie einer Pinchase-Funktion wird durch die im FRAP-Experiment ermittelte Halbwertszeit unterstützt, die mit den Mitgliedern der Dynamin-Superfamilie Drp1 und Dynamin-2 vergleichbar ist. Mx1 muss also zu einem späten Schritt der Vesikelbiogenese an die Membran rekrutiert werden, was mit einer Rolle in der Fission konform geht. Mx1 wirkt auf jeden Fall nicht als Sortierrezeptor wie z. B. Galectin-3. Ein Galectin-3-*knockdown* resultiert in einer Fehllokalisierung von apikalen Proteinen zur basolateralen Membran (Delacour *et al.*, 2006). Der Mx1-*knockdown* führte dagegen nur zu einem gezielten Defekt im apikalen Transport und nicht zu einer vermehrten basolateralen Beförderung.

Des Weiteren führte die Mx1-Reduktion bei den durchgeführten Transportstudien zu keinem kompletten Defekt in der Beförderung von p75<sup>NTR</sup>, gp80 oder Galectin-3. Die Proteine erreichten nach wie vor die Plasmamembran, jedoch in einem signifikant geringeren Ausmaß als in den Kontrollzellen. Dies könnte daran liegen, dass Mx1 redundant mit anderen Mitgliedern der Dynamin-Superfamilie arbeitet und das Fehlen von Mx1 teilweise durch andere Proteine ausgeglichen wird. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre z. B. Dynamin-2, das wie bereits beschrieben an der Vesikelbiogenese u. a. von p75<sup>NTR</sup> beteiligt ist. Auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit könnten beide Proteine Heterooligomere bilden, wie es auch für rekombinantem MxA und murinem neuronalen Dynamin beobachtet wurde (Jatani und Mittal, 2004). Dies würde auch die Kolokalisation in der IF-Studie und im PLA erklären. In COS-7-Zellen ist eine Doppelfärbung beider Proteine in größeren intrazellulären vesikulären Strukturen in einem perinukleären Bereich zu erkennen (siehe Abbildung 3.14 C). Auch der PLA zwischen Mx1 und Dynamin-2 zeigte in der Zelle verteilte Signale, so dass diese Kolokalisierung in endosomalen Kompartimenten, die von exozytotischem Material passiert werden, stattfinden könnte. Eine direkte Interaktion über Co-IP wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen. Interessanterweise sah man für Dynamin-2 in COS-7-Zellen eine prominente Färbung an der Plasmamembran, was für Mx1 nicht der Fall war. Diese distinkte Färbung könnte darauf hindeuten, dass beide Proteine in dieser Zelllinie auch divergente Aufgaben ausführen. So könnte in COS-7-Zellen ein hohes Maß an Dynamin-2-abhängiger Endozytose auftreten, die unabhängig von Mx1 abläuft.

Eine andere Möglichkeit für den beobachteten partiellen Transportdefekt könnte die nicht vollständige Reduktion von Mx1 durch die siRNA-Transfektion sein. Es wurde zwar ein *knockdown* von durchgehend hoher Effizienz etabliert, jedoch reicht die verbleibende Proteinmenge eventuell aus, um den Proteintransport in reduzierter Form zu gewährleisten. Hier würde sich die Wiederholung der Transportstudien im Hintergrund eines kompletten *knockouts* durch z. B. das CRISPR/Cas9-System anbieten.

#### **4.12 Mx1 wird polaritätsabhängig exprimiert und ist nicht ausschließlich durch Interferon reguliert**

In dieser Arbeit wurde separiert von den vorgestellten Experimenten zum Proteintransport die Expression von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarität und in verschiedenen zellulären Systemen untersucht. Dabei wurde durch Westernblotstudien herausgefunden, dass die Mx1-Proteinmenge im Zuge der Polarisierung von MDCK-Zellen zunächst hochreguliert wird und nach Erreichen der Polarität auf ein basales Ausgangsniveau abfällt und dort verbleibt (siehe Abbildung 3.19). Analog dazu wurde die Dynamin-2-Menge über den gleichen Zeitraum quantifiziert, wobei auch hier zunächst ein Anstieg in den frühen Tagen der Polarisierung zu erkennen war, die Proteinmenge aber nachfolgend auch im polaren Stadium erhöht blieb. Diese Schwankung in der Mx1-Biosynthese an verschiedenen Tagen nach der Aussaat wurde ebenfalls durch IF-Analysen bestätigt.

Man könnte vermuten, dass Mx1 mit Polarisierungsprozessen verbunden ist und dies ein weiterer Grund für die direkten Interaktionen mit Zytoskelettelementen ist, die zentrale Elemente in der Ausbildung eines polaren Zellrasens sind (Bacallao *et al.*, 1989, Rodriguez-Boulan und Macara, 2014). Allerdings erreichen Zellen trotz Mx1-*knockdown* ihre Polarität, wie vorhergehende Studien zeigten und ebenfalls in dieser Arbeit zu sehen ist (Greb, 2011). So konnten die Membranproteine CD29 und gp135 nach Mx1-Reduktion spezifisch an ihrer jeweiligen Domäne detektiert werden (siehe Abbildung 3.17 B-D). Auch in diesem Fall könnten andere Proteine die Funktion von Mx1 in den Polarisierungsprozessen übernehmen oder die verbleibende Proteinmenge reicht zur Ausbildung eines polaren Phänotyps aus. Eine weitere Erklärung könnte auch die Gestaltung der *knockdown*-Experimente sein, da die siRNA-Transfektion 24 Stunden nach der Aussaat der MDCK-Zellen erfolgte. Bis die Wirkung der siRNA eintritt vergehen erneut 24-48 Stunden, sodass die Zellen in diesem Zeitfenster bereits ihre Polarität erreicht haben. Da Mx1 nur in den ersten 2-3 Tagen nach der Aussaat hochreguliert wird, ist eine Funktion in der frühen Polarisierung und nicht zum Aufrechterhalten der Polarität denkbar. Auch hier wäre ein kompletter *knockout* von Mx1 für tiefergehende Studien sinnvoll.

Eine Rolle von Mx1 als Dynamin-ähnliches Protein ist in der Polarisierung vorstellbar, da bereits ein anderes Mitglied dieser Familie ebenfalls in diesem Prozess eine Funktion ausübt. So wird Dynamin-2 benötigt um eine polare Morphologie der Epithelzelle auszubilden (Chua *et al.*, 2009). Ein Dynamin-2-*knockdown* resultierte in einem unpolaren Phänotyp und abnormaler Aktin-Organisation. Es wurde herausgefunden, dass Dynamin-2 mit Cortactin interagiert, welches die Aktin Polymerisierung und eine

Umgestaltung der Filamente regulieren kann, beides Voraussetzungen für eine erfolgreiche Zellpolarisierung (Ammer und Weed, 2008). Darüber hinaus ist funktionelles Dynamin-2 auch bedeutend für die Aufrechterhaltung der Polarität, was sich in der Polaritätsstudie im höheren Proteinlevel in den Tagen nach der Polarisierung ausdrückt. Mx1 könnte während der Umgestaltung der zellulären Morphologie in Abhängigkeit von Dynamin-2 wirken, da die alleinige Reduktion von Dynamin-2 bereits die Polarisierung verhindert.

In einer weiteren Expressionsstudie wurde die Anwesenheit von Mx1 in verschiedenen Zelllinien untersucht, ohne vorherige Interferoninduktion. Wenn Mx1 grundlegende Funktionen im Proteintransport und eventuell auch weiteren zellulären Prozessen ausübt, so würde eine Expression von Mx1 in weiteren Zelllinien die Bedeutung der großen GTPase unterstützen. Tatsächlich wird Mx1 nicht nur in MDCK-Zellen exprimiert, sondern wurde auch in COS-7-Zellen, Caco-2 und HK-2-Zellen detektiert. Die Anwesenheit von Mx1 in unpolaren Zellen aus der Affenniere (COS-7) zeigt, dass dieses Protein, zumindest in der Zellkultur, nicht ausschließlich im epithelialen Kontext zu finden ist. Ferner beweist die Expression in humanen Darmepithelzellen (Caco-2), dass die basale Expression nicht nur im renalen System vorzufinden ist. Interessant ist, dass Mx1 nur gering in Caco-2-Zellen und überhaupt nicht in HeLa-Zellen detektierbar war, beides Zelllinien, die karzinologischen Ursprungs sind. MDCK, COS-7- und HK-2-Zellen wurden dagegen aus normalem Gewebe isoliert. Dies könnte die oben beschriebene Theorie von Brown und Kollegen, dass ein Verlust von Mx1 krebsfördernd ist, bestätigen (Brown *et al.*, 2015).

Diese Beobachtungen zeigen, dass Mx1 zumindest in diesen Zelllinien kein streng Interferon-reguliertes Protein ist, wie es weitläufig angenommen und postuliert wird (Haller und Kochs, 2002, Haller *et al.*, 2007). Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Mx1 z. B. in ovinen Drüsenepithelzellen (oGE) ebenfalls ohne Interferonbehandlung exprimiert wird (Racicot und Ott, 2011). Dies könnte in diesen Zellen auf Grund einer basalen Interferonsynthese ohne Virusinfektion stattfinden, jedoch werden andere Interferon-abhängige Proteine wie z. B. ISG15 dagegen nicht synthetisiert. Eine Analyse der Mx1-Promotorregion in oGE-Zellen konnte auch Bindungsstellen für verschiedene generelle Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 oder SP-1 nachweisen (Assiri und Ott, 2007). Des Weiteren wird Mx1 auch in Epithelzellen des Endometriums unabhängig von Interferon exprimiert, wobei hier eine hormonabhängige Synthese vermutet wird (Ott *et al.*, 1998). Dies lässt vermuten, dass Mx1 auch unabhängig von Interferon durch weitere Faktoren reguliert wird.

#### 4.13 Mx1 ist in distalen Tubuli und im Sammelrohr der humanen Niere lokalisiert

Bei der Expressionsanalyse in den verschiedenen Zelllinien wurden ebenso Lysate von humanen Nierenpräparaten auf ihren Mx1-Gehalt untersucht. Auch hier konnte die Synthese der großen GTPase festgestellt werden, wobei angemerkt werden muss, dass der virale Status der Patienten unbekannt ist und Mx1 in Folge einer Virusinfektion hochreguliert sein könnte.

Da die Studien dieser Arbeit mit Zellen des renalen Systems durchgeführt wurden und Mx1 auch in der humanen Nierenzelllinie HK-2 und humanen Nierenpräparaten detektierbar ist, wurde abschließend die Lokalisation der großen GTPase in Gewebeschnitten der humanen Niere analysiert (siehe Abbildung 3.21). Dabei wurde festgestellt, dass Mx1 gemeinsam mit Galectin-3 in Epithelzellen derselben Tubuli vorhanden ist und dort beide Proteine auch in vesikulären Strukturen koloalisieren. Ebenfalls wurde eine apikale Lokalisation für Mx1 und das Lektin beobachtet. Durch den Vergleich mit Markerproteinen und durch morphologische Gesichtspunkte konnten die Mx1-positiven Strukturen dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr zugeordnet werden. Die Epithelzellen des distalen Tubulus weisen im Vergleich zu denen des proximalen Tubulus weniger Mikrovilli auf ihrer luminalen Seite auf. Durch den kleineren Bürstensaum im distalen Tubulus ist das Lumen klarer vom Epithel abzugrenzen. Sammelrohre zeigen ebenfalls diese Morphologie, wobei sie einen vielfachen Durchmesser des distalen Tubulus besitzen. Die Galectin-3-Expression ist ebenfalls auf diese zwei Strukturen der Niere beschränkt (Straube *et al.*, 2011). Die Epithelzellen des proximalen Tubulus, positiv für Villin und CEACAM1, sind dagegen Mx1- und Galectin-3-negativ.

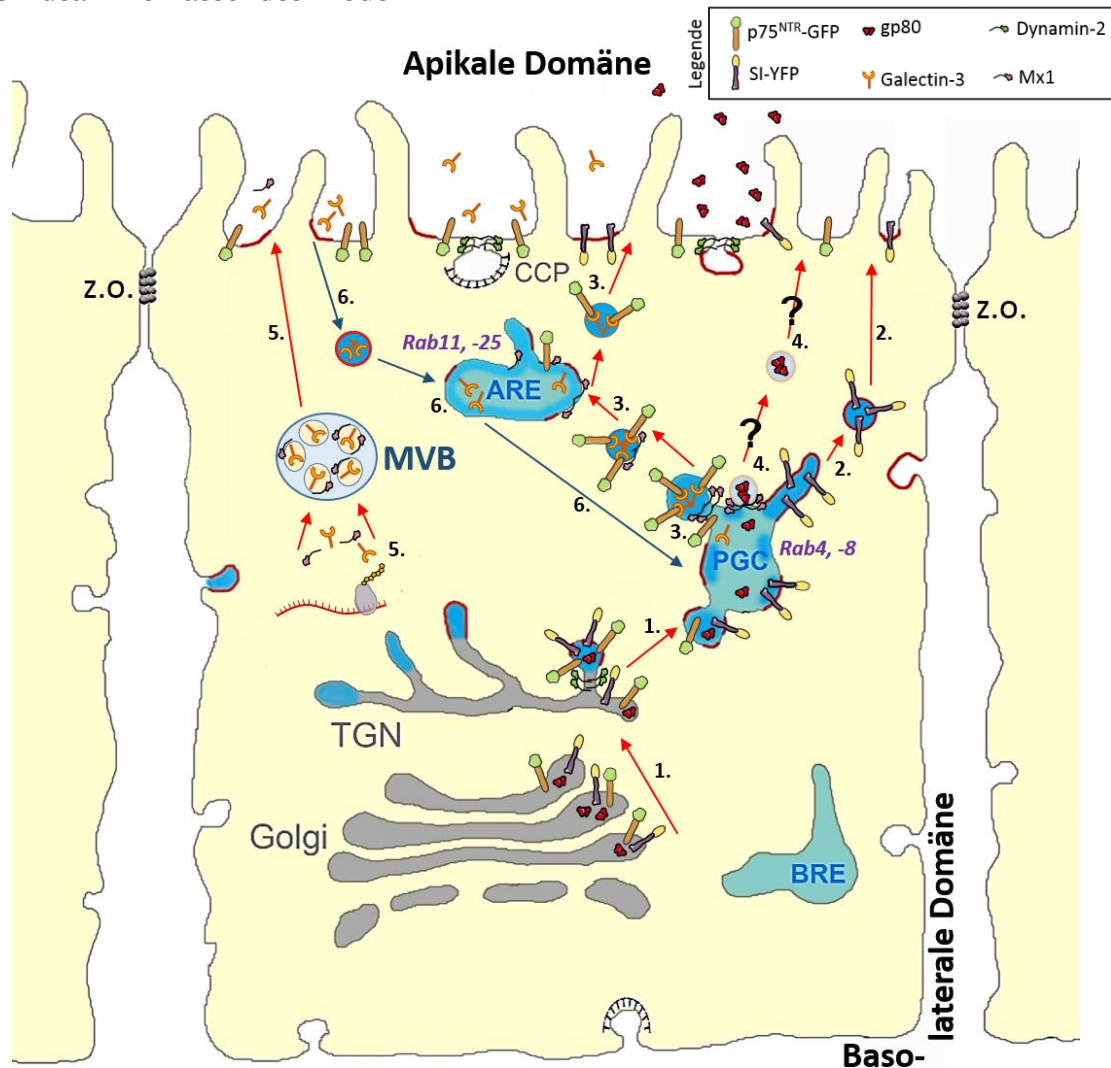
Der Ursprung von MDCK-Zellen liegt im distalen Tubulus der caninen Niere (Herzlinger *et al.*, 1982). Diese Lokalisation ist möglicherweise demnach auch auf das humane System übertragbar. Die Expression von Mx1 und Galectin-3 könnte verknüpft zu sein, sodass eine funktionelle Verbindung beider Proteine wie oben postuliert denkbar ist. Galectin-3 dient als Sortierrezeptor für sekretorische Proteine und Mx1 wirkt als Komponente der Vesikelbiogenese. In Epithelzellen des proximalen Tubulus, die für beide Proteine negativ sind ist es denkbar, dass andere Mitglieder derselben Proteinfamilien in einer ähnlichen Kombination wirken. So existieren in Nierenepithelzellen neben Galectin-3 noch eine Reihe weiterer Galectine, denen auch schon Funktionen im Proteintransport nachgewiesen wurden (Poland *et al.*, 2011, Mo *et al.*, 2012). Die Funktion von Mx1 könnte dort durch ein anderes Protein der Dynamin-Superfamilie ausgeführt werden.

#### 4.14 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die große GTPase Mx1 eine regulatorische Funktion im intrazellulären Proteintransport besitzt. Dies wurde bereits für andere Mitglieder der gleichen Protein-Superfamilie postuliert. Die bislang im Fokus der Forschung stehende antivirale Aktivität dieses Proteins könnte ein Ergebnis von Interaktionen mit Komponenten der zellulären Transportmaschinerie sein. Mx1 ist am biosynthetischen Transportweg von p75<sup>NTR</sup> beteiligt, welches *lipid raft*-unabhängig zur apikalen Membran befördert wird. Ebenfalls wirkt Mx1 im klassischen sekretorischen Transport von gp80 und in der unkonventionellen Sekretion von Galectin-3. Diese Funktionen werden wahrscheinlich durch eine Assoziation mit endosomalen Membranen bewerkstelligt. Zum einen könnte Mx1 hier wichtig zur Ausbildung eines Transportkomplexes von Vesikel und Motorproteinen sein. Eine andere Möglichkeit wäre eine Rolle als Fissionsfaktor in der Vesikelbiogenese, analog zu den klassischen Dynaminen. Diese These wird durch die ermittelte Halbwertszeit in FRAP-Experimenten, Strukturhomologien zu weiteren Dynamin-Proteinen und die Assemblierung an Lipidmembranen und ihrer Tubulierung unterstützt. Ein Mx1-*knockdown* würde zu einer reduzierten Vesikelentstehung und einer reduzierten Transportleistung führen, wie es auch in Studien dieser Arbeit beobachtet wurde. Betrachtet man die verschiedenen IF-Analysen, so kann Mx1 keinem Kompartiment ausschließlich zugeordnet werden, wie es z. B. für EEA1 und frühe Endosomen der Fall ist. Dies lässt darauf schließen, dass diese große GTPase an mehreren Positionen in der Zelle wirkt. So wurde Mx1 auch in Exosomen identifiziert und könnte hier als regulatorisches Element der unkonventionellen Sekretion dienen. Des Weiteren kann eine direkte Interaktion mit dem Tubulin- und Aktinzytoskelett ihren Ursprung entweder in einer Rolle im Proteintransport oder aber auch bei der Ausbildung der zellulären Morphologie haben. So wird Mx1 während der Zellpolarisierung hochreguliert und fällt anschließend wieder auf ein basales Ausgangsniveau zurück. Die Frage ist, ob Mx1 redundant mit anderen Proteinen der Dynamin-Superfamilie arbeitet oder ob eine geringe Menge dieses Proteins ausreicht, um die zelluläre Funktion teilweise aufrechtzuerhalten. Die Etablierung eines Mx1-*knockout* durch CRISPR/Cas9 und die Charakterisierung von Mx1-Interaktionspartnern sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden hier in Zukunft Antworten geben können. Des Weiteren muss untersucht werden, ob Mx1 nicht nur im anterograden Transportgeschehen wirkt, sondern auch an endozytotischen Prozessen bzw. am endosomalen Recycling beteiligt ist. Dies ist durch die hier durchgeführten IF-Studien und veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen vorstellbar. Die allgemeine Postulierung dass Mx-Proteine streng Interferon-reguliert sind und nur nach viralen Infektionen exprimiert werden, konnte in dieser Arbeit und auch in anderen Studien nicht bestätigt werden. Mx1 muss daher noch von weiteren Faktoren reguliert werden, woraus man ableiten kann, dass die antivirale Immunantwort nicht die alleinige, wenngleich eine wertvolle Aufgabe dieses Proteins ist. So kann dieser großen GTPase darüber hinaus eine Bedeutung in grundlegenden zellulären Prozessen zugeschrieben werden.



## 4.15 Zusammenfassendes Modell



**Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Modell dieser Arbeit**

Dieses graphische Modell stellt eines der möglichen Funktionsprinzipien von Mx1 im apikalen Proteintransport polarer Epithelzellen dar. Apikal sortierte Proteine verlassen das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in gemeinsamen Transportintermediaten und erreichen ein *post*-Golgi endosomales Kompartiment (PGC) (1). In diesem Kompartiment werden Transmembranproteine je nach ihrer Lipidaffinität in einen *lipid raft*-abhängigen bzw. *lipid raft*-unabhängigen Transportweg sortiert. So gelangt die Saccharase-Isomaltase (SI) in Abhängigkeit zu *lipid rafts* an die apikale Domäne (2). *Lipid raft*-unabhängige Proteine wie der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> werden mit Hilfe von Galectin-3 an anderen Membrandomänen des PGC in größere Proteinkomplexe eingebunden (3). Mx1 kann hier an der Fission von entstehenden Transportvesikeln beteiligt sein. *Lipid raft*-unabhängig beförderte Proteine gelangen daraufhin durch das apikale endosomale Netzwerk, mit dem Mx1 ebenfalls assoziiert ist, zur Plasmamembran. Das klassisch sekretierte lösliche Protein gp80 könnte ebenfalls mit Hilfe von Mx1 in Transportvesikel verpackt und abgeschnürt werden (4). In welcher Vesikelpopulation gp80 zur apikalen Membran gelangt ist jedoch unbekannt. Es ist möglich, dass gp80 zusammen mit p75<sup>NTR</sup> weitere endosomale Zwischenkompartimente passiert. Galectin-3 und Mx1 werden zunächst beide zytoplasmatisch synthetisiert und im Anschluss unkonventionell sekretiert (5). Der Sekretionsprozess wird wahrscheinlich über *Multivesicular Bodies* (MVB) und Exosomen bewerkstelligt (5). Beide Proteine wurden auf Exosomen detektiert, wobei Mx1 hier auch als Regulator der unkonventionellen Sekretion dienen könnte. Damit Galectin-3 als Sortierrezeptor im endosomalen Membransystem wirken kann, muss es nach der Sekretion endozytiert werden, wonach es ins apikale endosomale Netzwerk gelangt und dort mit Proteinen des biosynthetischen Transportwegs zusammentrifft (6). Es gilt zu beachten, dass die Natur des PGC noch nicht vollständig geklärt ist und es sich wahrscheinlich gemeinsam mit dem apikalen Recyclingendosom (ARE) um ein fließendes, dynamisches Membransystem handelt, das sich durch die Anwesenheit verschiedener Rab-Proteine an distinkten Membrandomänen auszeichnet. Als typische Rab-Proteine im exozytotischen, endosomalen Transportweg konnten Rab4, -8 und -11 identifiziert werden. Z.o.: *Zonula occludens*; CCP: *clathrin coated pit*, BRE: basolaterales Recyclingendosom (modifiziert nach Delacour und Jacob 2006).

## 5. Anhang

## 5.1 Weitere Ergebnisse

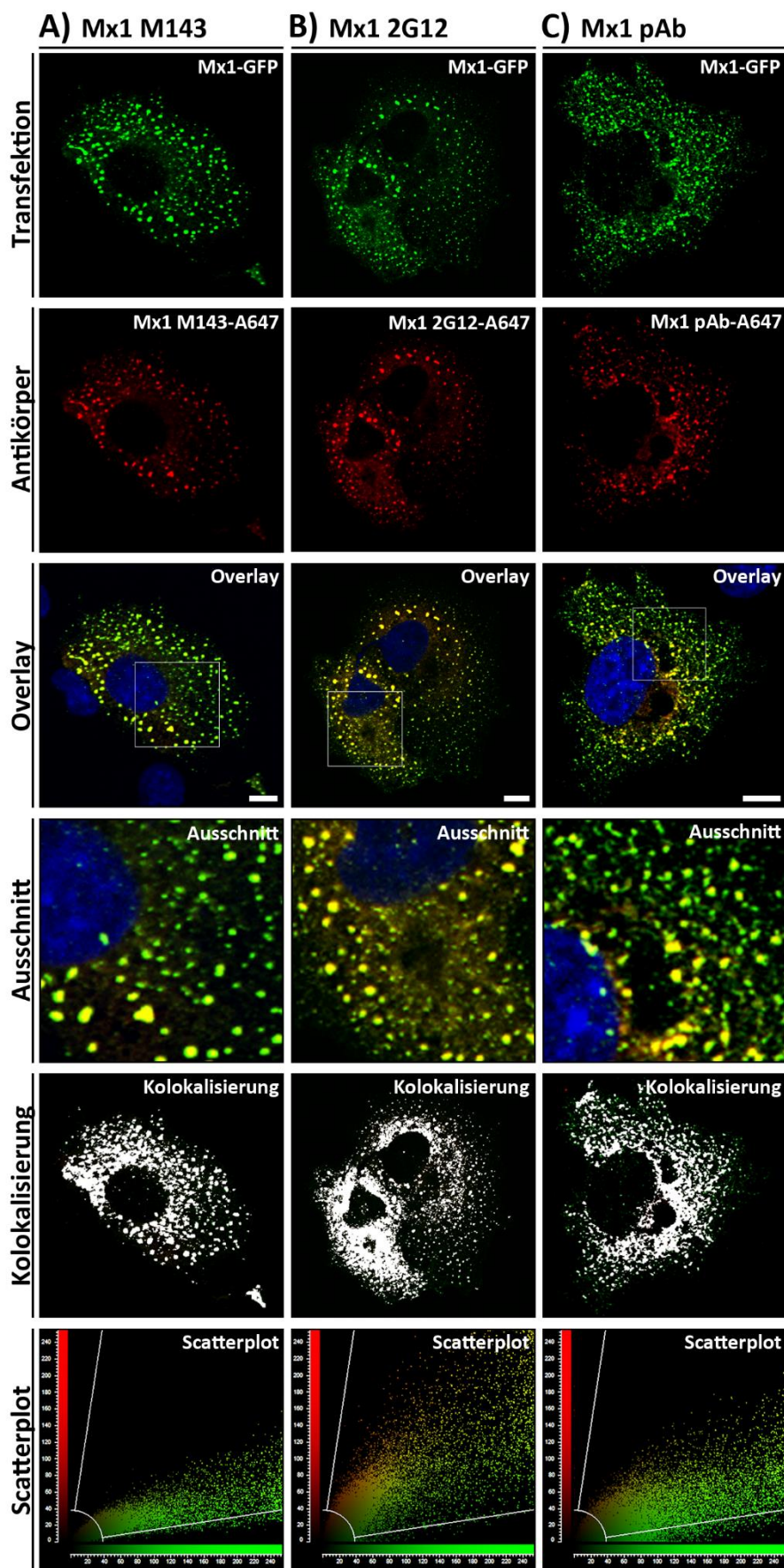
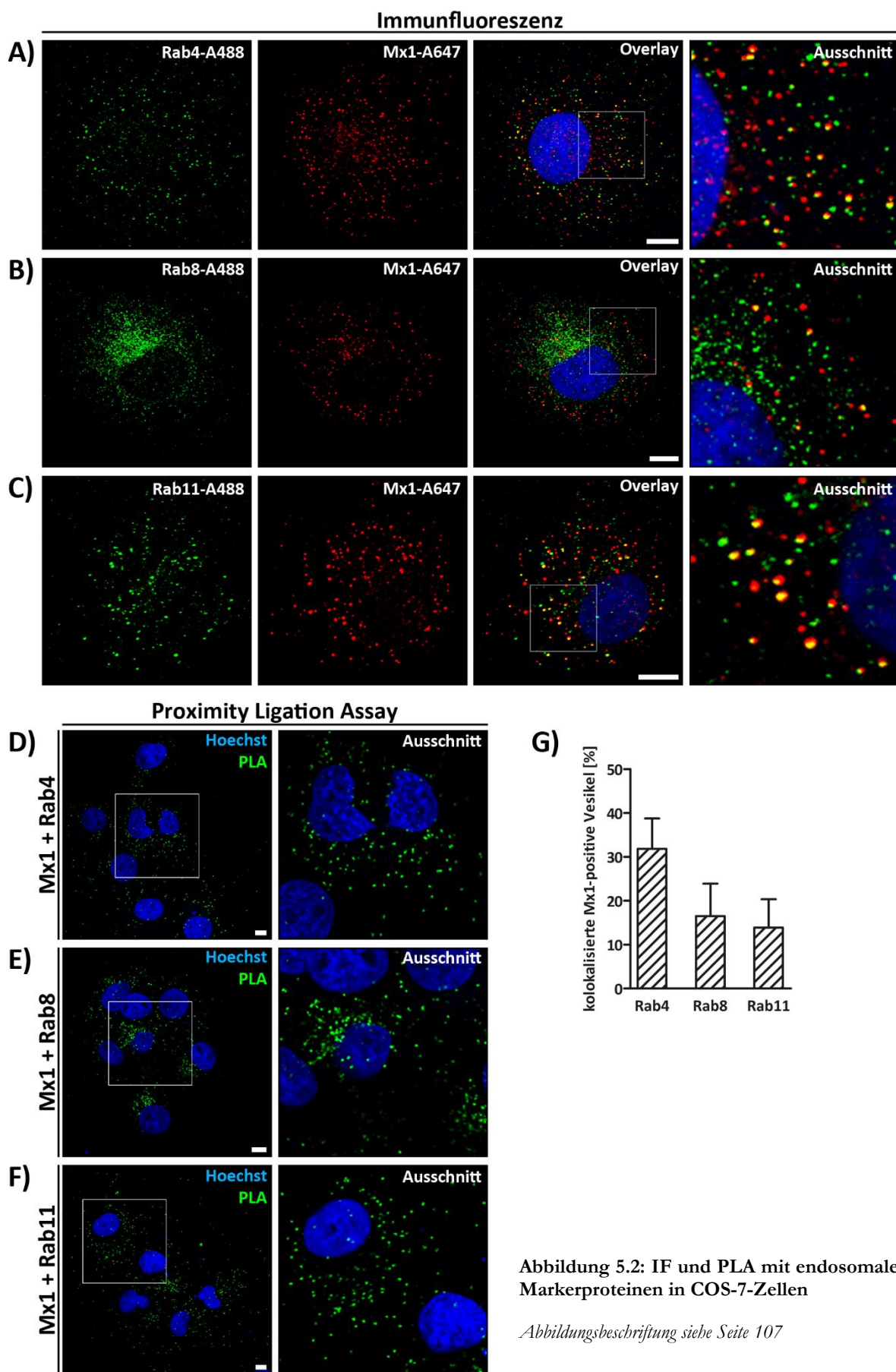


Abbildung 5.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in COS-7-Zellen

*Abbildungsbeschreibung siehe Seite 107*





### Abbildung 5.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in COS-7-Zellen

(siehe Seite 105) A-C) COS-7-Zellen wurden mit Mx1-GFP transfiziert, fixiert und eine Immunfluoreszenz mit verschiedenen Mx1-Antikörpern durchgeführt. Die Präparate wurden im KLSM betrachtet. Transfektion: Kanal des transfizierten Fluoreszenzproteins (grün), Antikörper: Kanal des verwendeten Mx1-Antikörpers gekoppelt an Alexa Fluor 647 (rot), Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kolokalisierung: Mit Hilfe der Software LAS AF (Leica Microsystems) wurden kolokalisierte Bereiche aus dem Overlay weiß dargestellt, Scatterplot: Verteilung der Fluoreszenzintensität von beiden Kanälen. Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M.

### Abbildung 5.2: Immunfluoreszenz und PLA mit endosomalen Markerproteinen in COS-7-Zellen

(siehe Seite 106) A-C) In COS-7-Zellen wurde eine Immunfluoreszenz gegen Rab4, -8, -11/Alexa Fluor 488 (grün) und gegen Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) durchgeführt. D-F) PLA (grün) mit denselben Antikörpern wie in A-C). G) Quantifizierung der Kolokalisierung von Mx1 mit Rab4 (n=7), mit Rab8 (n=7) und Rab11 (n=9) dargestellt wie in A-C) nach Manders mit Hilfe der Software Volocity (Perkin Elmer). Normalisiert wurde gegen die Summe aller Mx1-positiven Vesikel. Die Daten repräsentieren MW  $\pm$  SD. Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M.

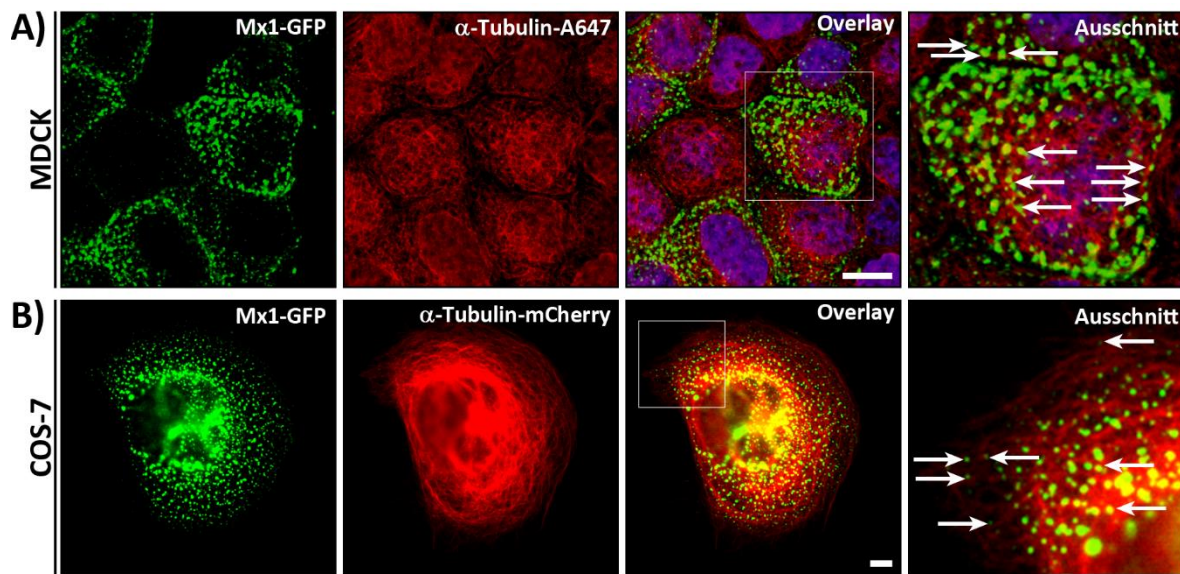


Abbildung 5.3: Mx1-GFP und  $\alpha$ -Tubulin in MDCK- und COS-7-Zellen

A) MDCK\_Mx1-GFP-Zellen wurden im polaren Zustand fixiert und eine IF gegen  $\alpha$ -Tubulin/Alexa Fluor 647 durchgeführt. Die Analyse erfolgte im KLSM. B) COS-7-Zellen wurden mit Mx1-GFP und  $\alpha$ -Tubulin-mCherry transfiziert und im Epifluoreszenzmikroskop betrachtet. Pfeile markieren Tubulin-assoziiertes Mx1. Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M.

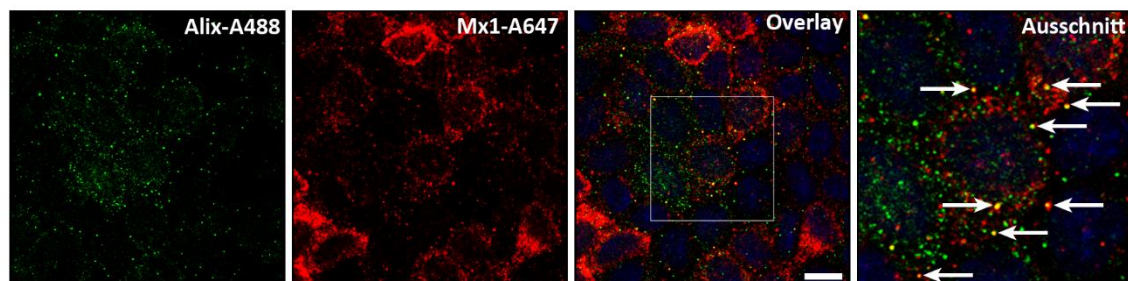


Abbildung 5.4: Immunfluoreszenz von Alix und Mx1 in MDCK-Zellen

Polare MDCK-Zellen wurden fixiert, Alix/Alexa Fluor 488 (grün) und Mx1/Alexa Fluor 647 (rot) immungefärbt. Die Präparate wurden im KLSM betrachtet. Pfeile markieren kolokalisierte Vesikel. Overlay: Überlagerung beider Kanäle, Ausschnitt: Vergrößerung eines Bildbereichs aus dem Overlay (siehe Kasten), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Größenbalken: 10  $\mu$ M. In Zusammenarbeit mit K. Ringer

## 5.2 Literaturverzeichnis

- Accola, M.A., Huang, B., Al Masri, A. & Mcniven, M.A., 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 277, 21829-35.
- Altschuler, Y., Barbas, S.M., Terlecky, L.J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K.E. & Schmid, S.L., 1998. Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol*, 143, 1871-81.
- Ammer, A.G. & Weed, S.A., 2008. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton*, 65, 687-707.
- Assiri, A.M. & Ott, T.L., 2007. Cloning and characterizing of the ovine MX1 gene promoter/enhancer region. *Dev Comp Immunol*, 31, 847-57.
- Astanina, K. & Jacob, R., 2010. KIF5C, a kinesin motor involved in apical trafficking of MDCK cells. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1331-42.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W.W., 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J*, 16, 1055-69.
- Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E.H. & Simons, K., 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol*, 109, 2817-32.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A. & Leffler, H., 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269, 20807-10.
- Bezanilla, M., Gladfelter, A.S., Kovar, D.R. & Lee, W.L., 2015. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J Cell Biol.* (c) 2015 Bezanilla et al, 329-337.
- Bhuin, T. & Roy, J.K., 2014. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res*, 328, 1-19.
- Bielli, A., Thornqvist, P.O., Hendrick, A.G., Finn, R., Fitzgerald, K. & Mccaffrey, M.W., 2001. The small GTPase Rab4A interacts with the central region of cytoplasmic dynein light intermediate chain-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 281, 1141-53.
- Bonekamp, N.A., Vormund, K., Jacob, R. & Schrader, M., 2010. Dynamin-like protein 1 at the Golgi complex: a novel component of the sorting/targeting machinery en route to the plasma membrane. *Exp Cell Res*, 316, 3454-67.
- Brantis-De-Carvalho, C.E., Maarifi, G., Gonçalves Boldrin, P.E., Zanelli, C.F., Nisole, S., Chelbi-Alix, M.K. & Valentini, S.R., 2015. MxA interacts with and is modified by the SUMOylation machinery. *Exp Cell Res*, 330, 151-63.
- Bretschneider, S., Eggeling, C. & Hell, S.W., 2007. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys Rev Lett*, 98, 218103.
- Brewer, C.B. & Roth, M.G., 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol*, 114, 413-21.
- Brown, D.A. & Rose, J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-44.

- Brown, P.S., Wang, E., Aroeti, B., Chapin, S.J., Mostov, K.E. & Dunn, K.W., 2000. Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic*, 1, 124-40.
- Brown, S.G., Knowell, A.E., Hunt, A., Patel, D., Bhosle, S. & Chaudhary, J., 2015. Interferon inducible antiviral MxA is inversely associated with prostate cancer and regulates cell cycle, invasion and Docetaxel induced apoptosis. *Prostate*, 75, 266-79.
- Casanova, J.E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S.G., Navarre, J., Woodrum, J.E., Altschuler, Y., Ray, G.S. & Goldenring, J.R., 1999. Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 10, 47-61.
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C. & Nixon, R.A., 1997. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci*, 17, 6142-51.
- Chaudhury, A., He, X.D. & Goyal, R.K., 2011. Myosin Va plays a key role in nitrenergic neurotransmission by transporting nNOSalpha to enteric varicosity membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301, G498-507.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. & Zerial, M., 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, 62, 317-29.
- Chen, J.W., Cha, Y., Yuksel, K.U., Gracy, R.W. & August, J.T., 1988. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. Sequence similarity to proteins bearing onco-differentiation antigens. *J Biol Chem*, 263, 8754-8.
- Christoforidis, S. & Zerial, M., 2000. Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods*, 20, 403-10.
- Chua, J., Rikhy, R. & Lippincott-Schwartz, J., 2009. Dynamin 2 orchestrates the global actomyosin cytoskeleton for epithelial maintenance and apical constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20770-5.
- Colombo, M., Raposo, G. & Thery, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- Cook, T.A., Urrutia, R. & McNiven, M.A., 1994. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 644-8.
- Cramm-Behrens, C.I., Dienst, M. & Jacob, R., 2008. Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic*, 9, 2206-20.
- Cresawn, K.O., Potter, B.A., Oztan, A., Guerriero, C.J., Ihrke, G., Goldenring, J.R., Apodaca, G. & Weisz, O.A., 2007. Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *Embo j*, 26, 3737-48.
- De Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H. & Williams, B.R., 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*, 69, 912-20.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y. & Jacob, R., 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol*, 16, 408-14.

- Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., Le Bivic, A., Gabius, H.J., Manninen, A., Simons, K. & Huet, G., 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol*, 169, 491-501.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A. & Jacob, R., 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic*, 8, 379-88.
- Delacour, D., Koch, A. & Jacob, R., 2009. The role of galectins in protein trafficking. *Traffic*, 10, 1405-13.
- Eidelman, S., Damsky, C.H., Wheelock, M.J. & Damjanov, I., 1989. Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol*, 135, 101-10.
- Eisenreich, A., 2009. Differenzielle Regulation des Zytokin-induzierten alternativen Spleißens des TF-Gens in humanen Endothelzellen. *Dissertation HU Berlin*.
- Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J. & Lippincott-Schwartz, J., 1997. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol*, 138, 1193-206.
- Escudero, C.A., Lazo, O.M., Galleguillos, C., Parraguez, J.I., Lopez-Verrilli, M.A., Cabeza, C., Leon, L., Saeed, U., Retamal, C., Gonzalez, A., Marzolo, M.P., Carter, B.D., Court, F.A. & Bronfman, F.C., 2014. The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release. *J Cell Sci*, 127, 1966-79.
- Ferguson, S.M. & De Camilli, P., 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 75-88.
- Folling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C.A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C. & Hell, S.W., 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Methods*, 5, 943-5.
- Folsch, H., 2008. Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 208-13.
- Folsch, H., Mattila, P.E. & Weisz, O.A., 2009. Taking the scenic route: biosynthetic traffic to the plasma membrane in polarized epithelial cells. *Traffic*, 10, 972-81.
- Gao, S., Von Der Malsburg, A., Dick, A., Faelber, K., Schröder, G.F., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O., 2011. Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity*, 35, 514-25.
- Gao, S., Von Der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O., 2010. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature*, 465, 502-6.
- Gaush, C.R., Hard, W.L. & Smith, T.F., 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med*, 122, 931-5.
- Gautreau, A., Oguievetskaia, K. & Ungermann, C., 2014. Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- Gidon, A., Bardin, S., Cinquin, B., Boulanger, J., Waharte, F., Heliot, L., De La Salle, H., Hanau, D., Kervrann, C., Goud, B. & Salamero, J., 2012. A Rab11A/myosin Vb/Rab11-FIP2 complex frames two late recycling steps of langerin from the ERC to the plasma membrane. *Traffic*, 13, 815-33.



- Glickman, J.N., Conibear, E. & Pearce, B.M., 1989. Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Embo j*, 8, 1041-7.
- Goldenring, J.R., 2015. Recycling endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 117-122.
- Goldenring, J.R., Shen, K.R., Vaughan, H.D. & Modlin, I.M., 1993. Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung. *J Biol Chem*, 268, 18419-22.
- Gonzalez, A. & Rodriguez-Boulan, E., 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett*, 583, 3784-95.
- Goodwin, J.S. & Kenworthy, A.K., 2005. Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells. *Methods*, 37, 154-64.
- Greb, C., 2011. *Proteinkomponenten und Transportwege an der apikalen Membran polarer Epithelzellen* Marburg: Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Grindstaff, K.K., Bacallao, R.L. & Nelson, W.J., 1998. Apiconuclear organization of microtubules does not specify protein delivery from the trans-Golgi network to different membrane domains in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 9, 685-99.
- Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H. & Bothwell, M., 1985. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem*, 260, 8044-9.
- Guerriero, C.J., Lai, Y. & Weisz, O.A., 2008. Differential sorting and Golgi export requirements for raft-associated and raft-independent apical proteins along the biosynthetic pathway. *J Biol Chem*, 283, 18040-7.
- Haller, O., Arnheiter, H., Gresser, I. & Lindenmann, J., 1979. Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J Exp Med*, 149, 601-12.
- Haller, O. & Kochs, G., 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3, 710-7.
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M. & Kochs, G., 2015. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol*, 23, 154-63.
- Haller, O., Stertz, S. & Kochs, G., 2007. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect*, 9, 1636-43.
- Hannan, L.A., Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulan, E. & Edidin, M., 1993. Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells. *J Cell Biol*, 120, 353-8.
- Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A. & Marxer, A., 1985. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*, 101, 838-51.
- Herzlinger, D.A., Easton, T.G. & Ojakian, G.K., 1982. The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *J Cell Biol*, 93, 269-77.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S., 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 682-96.
- Hoff, F., 2015. How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy. *Leica Science Lab*

- Honig, E., Schneider, K. & Jacob, R., 2015. Recycling of galectin-3 in epithelial cells. *Eur J Cell Biol*.
- Horgan, C.P., Hanscom, S.R., Jolly, R.S., Futter, C.E. & Mccaffrey, M.W., 2010. Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment. *J Cell Sci*, 123, 181-91.
- Horgan, C.P. & Mccaffrey, M.W., 2011. Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem Soc Trans*, 39, 1202-6.
- Horisberger, M.A., 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol*, 66, 4705-9.
- Hunziker, W. & Fumey, C., 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *Embo j*, 13, 2963-9.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M. & Naim, H.Y., 2003. Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol*, 13, 607-12.
- Jacob, R. & Naim, H.Y., 2001. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol*, 11, 1444-50.
- Jatiani, S.S. & Mittal, R., 2004. Expression of the antiviral protein MxA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 323, 541-6.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulant, E. & Kreitzer, G., 2007. Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell*, 13, 511-22.
- Jing, J. & Prekeris, R., 2009. Polarized endocytic transport: the roles of Rab11 and Rab11-FIPs in regulating cell polarity. *Histol Histopathol*, 24, 1171-80.
- Jones, S.M., Howell, K.E., Henley, J.R., Cao, H. & Mcniven, M.A., 1998. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*, 279, 573-7.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R. & Neefjes, J., 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*, 11, 1680-5.
- Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatzioannou, T. & Bieniasz, P.D., 2013. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502, 563-6.
- Kasai, K., Shin, H.W., Shinotsuka, C., Murakami, K. & Nakayama, K., 1999. Dynamin II is involved in endocytosis but not in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *J Biochem*, 125, 780-9.
- Keiser, M., Alfalah, M., Propsting, M.J., Castelletti, D. & Naim, H.Y., 2006. Altered folding, turnover, and polarized sorting act in concert to define a novel pathomechanism of congenital sucrase-isomaltase deficiency. *J Biol Chem*, 281, 14393-9.
- Keller, P. & Simons, K., 1998. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol*, 140, 1357-67.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. & Johnsson, K., 2003. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*. United States, 86-9.

- Keppler, A., Kindermann, M., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H. & Johnsson, K., 2004. Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods*, 32, 437-44.
- King, M.C., Raposo, G. & Lemmon, M.A., 2004. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8957-62.
- King, S.M., 2000. The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta*, 1496, 60-75.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U. & Haller, O., 2002. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem*, 277, 14172-6.
- Kochs, G. & Haller, O., 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2082-6.
- Koivisto, U.M., Hubbard, A.L. & Mellman, I., 2001. A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell*, 105, 575-85.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. & Rodriguez-Boulan, E., 2000. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol*, 2, 125-7.
- Kroschewski, R., Hall, A. & Mellman, I., 1999. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol*, 1, 8-13.
- Ku, C.C., Che, X.B., Reichelt, M., Rajamani, J., Schaap-Nutt, A., Huang, K.J., Sommer, M.H., Chen, Y.S., Chen, Y.Y. & Arvin, A.M., 2011. Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunol Cell Biol*, 89, 173-82.
- Kundu, A., Avalos, R.T., Sanderson, C.M. & Nayak, D.P., 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol*, 70, 6508-15.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M.T., Benzing, C., Arumugam, S., Sales, S., Ariotti, N., Chambon, V., Lamaze, C., Loew, D., Shevchenko, A., Gaus, K., Parton, R.G. & Johannes, L., 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*, 16, 595-606.
- Lampe, M., 2012. Widefield Super-Resolution with GSDIM. *Leica Science Lab*.
- Lapierre, L.A., Kumar, R., Hales, C.M., Navarre, J., Bhartur, S.G., Burnette, J.O., Provance, D.W., Jr., Mercer, J.A., Bahler, M. & Goldenring, J.R., 2001. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell*, 12, 1843-57.
- Le Bivic, A., Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M. & Rodriguez-Boulan, E., 1991. An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J Cell Biol*, 115, 607-18.
- Li, N., Zhang, L., Chen, L., Feng, W., Xu, Y., Chen, F., Liu, X., Chen, Z. & Liu, W., 2012. MxA inhibits hepatitis B virus replication by interaction with hepatitis B core antigen. *Hepatology*, 56, 803-11.
- Lin, S., Naim, H.Y., Rodriguez, A.C. & Roth, M.G., 1998. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 142, 51-7.

- Lindenmann, J., 1962. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, 16, 203-4.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E. & Leffler, H., 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem*, 268, 11750-7.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A. & Rodriguez-Boulan, E., 1989. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 109, 2145-56.
- Liu, Y.W., Lukiyanchuk, V. & Schmid, S.L., 2011. Common membrane trafficking defects of disease-associated dynamin 2 mutations. *Traffic*, 12, 1620-33.
- Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F. & Liang, C., 2013. The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*, 14, 398-410.
- Lock, J.G. & Stow, J.L., 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell*, 16, 1744-55.
- Low, H.H. & Lowe, J., 2010. Dynamin architecture--from monomer to polymer. *Curr Opin Struct Biol*, 20, 791-8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- Marzolo, M.P., Yuseff, M.I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfan, P., Li, Y. & Bu, G., 2003. Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic*, 4, 273-88.
- Matlin, K.S. & Simons, K., 1983. Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell*, 34, 233-43.
- Matter, K., Hunziker, W. & Mellman, I., 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*, 71, 741-53.
- Matter, K., Yamamoto, E.M. & Mellman, I., 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol*, 126, 991-1004.
- Mays, R.W., Siemers, K.A., Fritz, B.A., Lowe, A.W., Van Meer, G. & Nelson, W.J., 1995. Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 130, 1105-15.
- Mcmahon, H.T. & Boucrot, E., 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 517-33.
- Mehul, B. & Hughes, R.C., 1997. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci*, 110 ( Pt 10), 1169-78.
- Mellman, I. & Nelson, W.J., 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 833-45.
- Mo, D., Costa, S.A., Ihrke, G., Youker, R.T., Pastor-Soler, N., Hughey, R.P. & Weisz, O.A., 2012. Sialylation of N-linked glycans mediates apical delivery of endolyn in MDCK cells via a galectin-9-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 23, 3636-46.
- Mohrmann, K., Leijendekker, R., Gerez, L. & Van Der Sluijs, P., 2002. rab4 regulates transport to the apical plasma membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 277, 10474-81.

- Morrison, H.A., Dionne, H., Rusten, T.E., Brech, A., Fisher, W.W., Pfeiffer, B.D., Celniker, S.E., Stenmark, H. & Bilder, D., 2008. Regulation of early endosomal entry by the *Drosophila* tumor suppressors Rabenosyn and Vps45. *Mol Biol Cell*, 19, 4167-76.
- Mostov, K.E., De Bruyn Kops, A. & Deitcher, D.L., 1986. Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell*, 47, 359-64.
- Mottola, G., Classen, A.K., Gonzalez-Gaitan, M., Eaton, S. & Zerial, M., 2010. A novel function for the Rab5 effector Rabenosyn-5 in planar cell polarity. *Development*, 137, 2353-64.
- Mu, F.T., Callaghan, J.M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R.G., Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., Tock, E.P. & Toh, B.H., 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem*, 270, 13503-11.
- Musch, A., Cohen, D., Kreitzer, G. & Rodriguez-Boulán, E., 2001. cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *Embo j*, 20, 2171-9.
- Naesens, M., Steels, P., Verberckmoes, R., Vanrenterghem, Y. & Kuypers, D., 2004. Bartter's and Gitelman's syndromes: from gene to clinic. *Nephron Physiol*, 96, p65-78.
- Nakamura, T., Asano, A., Okano, S., Ko, J.H., Kon, Y., Watanabe, T. & Agui, T., 2005. Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 169-73.
- Naslavsky, N., Boehm, M., Backlund, P.S., Jr. & Caplan, S., 2004. Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 15, 2410-22.
- Nathke, I.S., Hinck, L., Swedlow, J.R., Papkoff, J. & Nelson, W.J., 1994. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 125, 1341-52.
- Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y., Zhang, Z. & Hirokawa, N., 2001. KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol*, 155, 77-88.
- Noguchi, S., Hijikata, M., Hamano, E., Matsushita, I., Ito, H., Ohashi, J., Nagase, T. & Keicho, N., 2013. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics*, 65, 107-14.
- Ocklind, C., Forsum, U. & Obrink, B., 1983. Cell surface localization and tissue distribution of a hepatocyte cell-cell adhesion glycoprotein (cell-CAM 105). *J Cell Biol*, 96, 1168-71.
- Ockenga, W., 2012. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Leica Science Lab*.
- Odorizzi, G. & Trowbridge, I.S., 1997. Structural requirements for basolateral sorting of the human transferrin receptor in the biosynthetic and endocytic pathways of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 137, 1255-64.
- Ohkura, T., Momose, F., Ichikawa, R., Takeuchi, K. & Morikawa, Y., 2014. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. *J Virol*, 88, 10039-55.
- Ojakian, G.K. & Schwimmer, R., 1988. The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 107, 2377-87.

- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G. & Belenguer, P., 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, 523, 171-6.
- Ott, T.L., Yin, J., Wiley, A.A., Kim, H.T., Gerami-Naini, B., Spencer, T.E., Bartol, F.F., Burghardt, R.C. & Bazer, F.W., 1998. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, 59, 784-94.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Tivodar, S. & Zurzolo, C., 2007. Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins. *Traffic*, 8, 251-8.
- Palm, M., Garigliany, M.M., Cornet, F. & Desmecht, D., 2010. Interferon-induced *Sus scrofa* Mx1 blocks endocytic traffic of incoming influenza A virus particles. *Vet Res*, 41, 29.
- Parczyk, K. & Koch-Brandt, C., 1991. The role of carbohydrates in vectorial exocytosis. The secretion of the gp 80 glycoprotein complex in a ricin-resistant mutant of MDCK cells. *FEBS Lett*, 278, 267-70.
- Parczyk, K. & Kondor-Koch, C., 1989. The influence of pH on the vesicular traffic to the surface of the polarized epithelial cell, MDCK. *Eur J Cell Biol*, 48, 353-9.
- Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G., 1993. hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 3, 151-5.
- Poland, P.A., Rondonino, C., Kinlough, C.L., Heimbürg-Molinaro, J., Arthur, C.M., Stowell, S.R., Smith, D.F. & Hughey, R.P., 2011. Identification and characterization of endogenous galectins expressed in Madin Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 286, 6780-90.
- Praefcke, G.J. & McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 133-47.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A. & Herrmann, C., 2000. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature*, 403, 567-71.
- Presley, J.F., Ward, T.H., Pfeifer, A.C., Siggia, E.D., Phair, R.D. & Lippincott-Schwartz, J., 2002. Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*, 417, 187-93.
- Puertollano, R., Van Der Wel, N.N., Greene, L.E., Eisenberg, E., Peters, P.J. & Bonifacino, J.S., 2003. Morphology and dynamics of clathrin/GGA1-coated carriers budding from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 14, 1545-57.
- Racicot, K. & Ott, T., 2011. The myxovirus resistance protein, MX1, interacts with tubulin beta in uterine glandular epithelial cells. *Am J Reprod Immunol*, 65, 44-53.
- Racicot, K., Schmitt, A. & Ott, T., 2012. The myxovirus-resistance protein, MX1, is a component of exosomes secreted by uterine epithelial cells. *Am J Reprod Immunol*, 67, 498-505.
- Rapsomaniki, M.A., Kotsantis, P., Symeonidou, I.E., Giakoumakis, N.N., Taraviras, S. & Lygerou, Z., 2012. easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics*, 28, 1800-1.

- Reichelt, M., Stertz, S., Krijnse-Locker, J., Haller, O. & Kochs, G., 2004. Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic*, 5, 772-84.
- Rennie, M.L., Mckelvie, S.A., Bulloch, E.M. & Kingston, R.L., 2014. Transient dimerization of human MxA promotes GTP hydrolysis, resulting in a mechanical power stroke. *Structure*, 22, 1433-45.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M., 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
- Robine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A. & Louvard, D., 1985. Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8488-92.
- Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G. & Musch, A., 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 233-47.
- Rodriguez-Boulan, E. & Macara, I.G., 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 225-42.
- Rodriguez-Boulan, E. & Musch, A., 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta*, 1744, 455-64.
- Ross, J.L., Ali, M.Y. & Warshaw, D.M., 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 41-7.
- Ross, M.H. & Pawlina, W., 2010. Histology a text and atlas ; with correlated cell and molecular biology, 6. ed. Philadelphia, Pa., Kluwer.
- Salvarezza, S.B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M.M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G. & Rodriguez-Boulan, E., 2009. LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 20, 438-51.
- Scheiffele, P., Peranen, J. & Simons, K., 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature*, 378, 96-8.
- Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A., Delacour, D. & Jacob, R., 2010. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur J Cell Biol*, 89, 788-98.
- Schoenenberger, C.A., Zuk, A., Zinkl, G.M., Kendall, D. & Matlin, K.S., 1994. Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity. *J Cell Sci*, 107 ( Pt 2), 527-41.
- Schonteich, E., Wilson, G.M., Burden, J., Hopkins, C.R., Anderson, K., Goldenring, J.R. & Prekeris, R., 2008. The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *J Cell Sci*, 121, 3824-33.
- Shpetner, H.S. & Vallee, R.B., 1989. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, 59, 421-32.
- Simon, G.C. & Prekeris, R., 2008. Mechanisms regulating targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow during cytokinesis. *Biochem Soc Trans*, 36, 391-4.
- Simons, K. & Wandering-Ness, A., 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell*, 62, 207-10.



- Smaczynska-De Rooij, R., Ii, Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hetteema, E.H., Goldberg, M.W. & Ayscough, K.R., 2010. A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci*, 123, 3496-506.
- Smaczynska-De Rooij, R., Ii, Allwood, E.G., Mishra, R., Booth, W.I., Aghamohammadzadeh, S., Goldberg, M.W. & Ayscough, K.R., 2012. Yeast dynamin Vps1 and amphiphysin Rvs167 function together during endocytosis. *Traffic*, 13, 317-28.
- Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G. & Landegren, U., 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 3, 995-1000.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M., 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, 149, 901-14.
- Spodisberg, N., Jacob, R., Alfalah, M., Zimmer, K.P. & Naim, H.Y., 2001. Molecular basis of aberrant apical protein transport in an intestinal enzyme disorder. *J Biol Chem*, 276, 23506-10.
- Sprague, B.L. & McNally, J.G., 2005. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol*, 15, 84-91.
- Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J.G. & Haller, O., 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol*, 8, 4518-23.
- Stechly, L., Morelle, W., Dessen, A.F., Andre, S., Grard, G., Trinel, D., Dejonghe, M.J., Leteurtre, E., Drobecq, H., Trugnan, G., Gabius, H.J. & Huet, G., 2009. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic*, 10, 438-50.
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 513-25.
- Stertz, S., Reichelt, M., Krijnse-Locker, J., Mackenzie, J., Simpson, J.C., Haller, O. & Kochs, G., 2006. Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *J Interferon Cytokine Res*, 26, 650-60.
- Straube, T., Elli, A.F., Greb, C., Hegele, A., Elsasser, H.P., Delacour, D. & Jacob, R., 2011. Changes in the expression and subcellular distribution of galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 89.
- Straube, T., Von Mach, T., Honig, E., Greb, C., Schneider, D. & Jacob, R., 2013. pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*, 14, 1014-27.
- Sugaya, K., Seto, S., Tsujimura, K. & Koide, Y., 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem Biophys Res Commun*, 410, 371-5.
- Tai, A.W., Chuang, J.Z., Bode, C., Wolfrum, U. & Sung, C.H., 1999. Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell*, 97, 877-87.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. & De Camilli, P., 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, 374, 186-90.
- Tan, C.W., Gardiner, B.S., Hirokawa, Y., Layton, M.J., Smith, D.W. & Burgess, A.W., 2012. Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells. *PLoS One*, 7, e31882.

- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. & Amigorena, S., 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 166, 7309-18.
- Thompson, H.M., Cao, H., Chen, J., Euteneuer, U. & McNiven, M.A., 2004. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol*, 6, 335-42.
- Toyokawa, K., Carling, S.J. & Ott, T.L., 2007a. Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): I. Ovine Mx1 is secreted by endometrial epithelial cells via an 'unconventional' secretory pathway. *Am J Reprod Immunol*, 57, 13-22.
- Toyokawa, K., Leite, F. & Ott, T.L., 2007b. Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): II. The oMx1 protein is a regulator of secretion in an ovine glandular epithelial cell line. *Am J Reprod Immunol*, 57, 23-33.
- Ueno, H., Huang, X., Tanaka, Y. & Hirokawa, N., 2011. KIF16B/Rab14 molecular motor complex is critical for early embryonic development by transporting FGF receptor. *Dev Cell*, 20, 60-71.
- Vale, R.D., 1990. Microtubule-based motor proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2, 15-22.
- Vallee, R.B. & Shpetner, H.S., 1990. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu Rev Biochem*, 59, 909-32.
- Van Der Blik, A.M. & Meyerowitz, E.M., 1991. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature*, 351, 411-4.
- Van Meer, G. & Simons, K., 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem*, 36, 51-8.
- Verhelst, J., Hulpiau, P. & Saelens, X., 2013. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77, 551-66.
- Vieira, O.V., Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D. & Grinstein, S., 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 23, 2501-14.
- Von Der Malsburg, A., Abutbul-Ionita, I., Haller, O., Kochs, G. & Danino, D., 2011. Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J Biol Chem*, 286, 37858-65.
- Wasiak, S., Zunino, R. & McBride, H.M., 2007. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol*, 177, 439-50.
- Weisz, O.A. & Rodriguez-Boulán, E., 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci*, 122, 4253-66.
- Welton, J.L., Khanna, S., Giles, P.J., Brennan, P., Brewis, I.A., Staffurth, J., Mason, M.D. & Clayton, A., 2010. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1324-38.
- Welz, T., Wellbourne-Wood, J. & Kerkhoff, E., 2014. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol*, 24, 407-15.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. & Salamero, J., 2000. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol*, 151, 1207-20.
- Williams, M. & Kim, K., 2014. From membranes to organelles: emerging roles for dynamin-like proteins in diverse cellular processes. *Eur J Cell Biol*, 93, 267-77.

- Wright, E.M., Harms, V., Mircheff, A.K. & Van Os, C.H., 1981. Transport properties of intestinal basolateral membranes. *Ann N Y Acad Sci*, 372, 626-36.
- Wu, X., Zhao, X., Baylor, L., Kaushal, S., Eisenberg, E. & Greene, L.E., 2001. Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 155, 291-300.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A. & Rodriguez-Boulan, E., 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 139, 929-40.
- Yoon, Y., Pitts, K.R. & Mcniven, M.A., 2001. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell*, 12, 2894-905.
- Yu, X. & Cai, M., 2004. The yeast dynamin-related GTPase Vps1p functions in the organization of the actin cytoskeleton via interaction with Sla1p. *J Cell Sci*, 117, 3839-53.
- Zhang, J., Pekosz, A. & Lamb, R.A., 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol*, 74, 4634-44.

## 5.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau einer polaren Epithelzelle.....	2
Abbildung 1.2: Transportwege in polaren Epithelzellen.....	5
Abbildung 1.3: Modell für die <i>lipid raft</i> -abhängige bzw. -unabhängige apikale Sortierung.....	8
Abbildung 1.4: Zytoskelettkomponenten und Motorproteine im polaren Proteintransport.....	9
Abbildung 1.5: Domänenstruktur der Dynamin-Superfamilie Mitglieder .....	11
Abbildung 1.6: Lokalisierung und Funktion der Dynamin-Superfamilie Mitglieder.....	12
Abbildung 1.7: Funktionsweise von Dynamin in der Clathrin-abhängigen Endozytose.....	13
Abbildung 1.8: Phylogenetischer Baum der verschiedenen Mx-Proteine .....	15
Abbildung 1.9: Struktur der humanen Mx-Proteine und humanem Dynamin-1 .....	16
Abbildung 2.1: Kultivierung von MDCK-Zellen auf Filtereinsätzen .....	19
Abbildung 2.2: Aufbau eines Westernblots im <i>semidry</i> -Verfahren .....	27
Abbildung 2.3: Jablonski Diagramm .....	32
Abbildung 2.4: Funktionsprinzip der TIRFM .....	33
Abbildung 2.5: Prinzip eines FRAP-Experiments .....	36
Abbildung 2.6: ROI-Auswahl zur Quantifizierung eines FRAP-Experiments .....	36
Abbildung 2.7: Ablauf einer Immunfluoreszenz in polaren Epithelzellen .....	38
Abbildung 2.8: Ablauf des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	39
Abbildung 3.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen (I) .....	50
Abbildung 3.2: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen (II) .....	51
Abbildung 3.3: Biochemische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in MDCK-Zellen.....	52
Abbildung 3.4: Visualisierung von Mx1 mit p75-GFP in MDCK-Zellen.....	54
Abbildung 3.5: Immunfluoreszenz von Mx1 und p75 <sub>SNAP</sub> nach TGN-Exit .....	55
Abbildung 3.6: GSDIM- und FRAP-Analyse von Mx1-positiven Strukturen .....	57
Abbildung 3.7: Immunfluoreszenz mit endosomalen Markerproteinen in MDCK-Zellen .....	59
Abbildung 3.8: Quantifizierung der IF mit endosomalen Markerproteinen in MDCK-Zellen.....	60
Abbildung 3.9: Spezifitätstest des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	62
Abbildung 3.10: TIRF-Mikroskopie und PLA von Mx1 und Galectin-3.....	64
Abbildung 3.11: Visualisierung von Mx1 mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten .....	66
Abbildung 3.12: PLA und Co-IP von Mx1 mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten.....	67
Abbildung 3.13: Immunfluoreszenz und PLA von Mx1 mit Motorproteinen in MDCK-Zellen .....	70
Abbildung 3.14: Immunfluoreszenz und PLA von Mx1 und Dynamin-2.....	72
Abbildung 3.15: siRNA-Transfektionseffizienz und Mx1- <i>knockdown</i> -Spezifität .....	73
Abbildung 3.16: Sekretionsstudie nach Mx1- <i>knockdown</i> .....	74
Abbildung 3.17: Oberflächenbiotinylierung von p75-GFP nach Mx1- <i>knockdown</i> .....	76

Abbildung 3.18: Oberflächen-Immunpräzipitation nach Mx1- <i>knockdown</i> .....	78
Abbildung 3.19: Expression von Mx1 in Abhängigkeit zur Zellpolarität .....	80
Abbildung 3.20: Expression von Mx1 in verschiedenen zellulären Systemen .....	81
Abbildung 3.21: Immunhistochemie von Mx1 in humanen Nierenpräparaten. ....	82
Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Modell dieser Arbeit .....	104
Abbildung 5.1: Mikroskopische Validierung der Mx1-Antikörperspezifität in COS-7-Zellen .....	105
Abbildung 5.2: IF und PLA mit endosomalen Markerproteinen in COS-7-Zellen .....	106
Abbildung 5.3: Mx1-GFP und $\alpha$ -Tubulin in MDCK- und COS-7-Zellen.....	107
Abbildung 5.4: Immunfluoreszenz von Alix und Mx1 in MDCK-Zellen .....	107

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Kulturmedien .....	22
Tabelle 2.2: Medien und Puffer für die Zellkultur .....	23
Tabelle 2.3: verwendete Plasmide / siRNA .....	23
Tabelle 2.4: Pipettierschema für SDS-PAGE-Gele (10 mL) unterschiedlicher Acrylamidkonzentration ...	26
Tabelle 2.5: Verwendete Fluorophore und ihr Exzitations- und Emissionsspektrum.....	35
Tabelle 2.6: Verwendete Erstantikörper mit eingesetzter Verdünnung in den verschiedenen Anwendungen .....	42
Tabelle 2.7: Verwendete Zweitantikörper mit eingesetzter Verdünnung in den verschiedenen Anwendungen .....	43
Tabelle 2.8: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle .....	44
Tabelle 2.9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquelle.....	45
Tabelle 4.1: Halbwertszeiten verschiedener Proteine in FRAP-Experimenten.....	89

## 5.4 Lebenslauf

**Name:** Florian Hoff  
**Geburtsdatum:** 06.02.1986  
**Geburtsort:** Mönchengladbach

---

### Akademische Ausbildung

**11/2011 – 11/2015**      **Philipps-Universität Marburg**  
 Promotionsstudium  
 Titel der Dissertation: „Charakterisierung der großen GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) im intrazellulären Proteintransport“

**01/2012 – 01/2015**      **DFG Graduiertenkolleg 1216**  
 „Intra- and Intercellular Transport and Communication“  
 Assoziiertes Mitglied und studentischer Sprecher

**10/2009 – 10/2011**      **Philipps-Universität Marburg**  
 Studiengang *Molecular & Cellular Biology – Master of Science*  
 Titel der Masterarbeit: „Charakterisierung der zellulären Apoptoseinduktion von *Viscum album* L. bei der akuten myeloiden Leukämie“

**10/2006 – 06/2009**      **Philipps-Universität Marburg**  
 Studiengang *Biology – Bachelor of Science*  
 Titel der Bachelorarbeit: „Charakterisierung der zellulären Lokalisation und Rolle von GRINA im polaren und unpolaren Zellsystem“

**1996-2005**                **Gymnasium Bischöfliche Marienschule Mönchengladbach**  
 Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

---

### Beruflicher Werdegang

**11/2011 – 12/2015**      **Institut für Klinische Zytobiologie & Zytopathologie**  
 Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg  
 Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Jacob  
 Wissenschaftlicher Mitarbeiter

**09/2010 – 10/2011**      **Charité – Universitätsmedizin Berlin**  
 Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie & Onkologie  
 Arbeitsgruppe Integrative Medizin, Prof. Dr. Georg Seifert  
 Masterstudent / Hilfskraft

**10/2008 – 07/2010**      **Institut für Klinische Zytobiologie & Zytopathologie**  
 Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg  
 Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Jacob  
 Bachelorstudent / Hilfskraft

09/2008 – 10/2008      **Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg**  
Speziallabor Neurogenetik, PD. Dr. Dirk Montag  
Forschungsaufenthalt

## 5.5 Publikationen & Poster

Delebinski C.I., Twardziok M., Kleinsimon S., Hoff E., Mulsow K., Rolff J., Jäger S., Eggert A., Seifert G. A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo. *PLoS ONE* (2015)

Hoff E. How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy. *Science Lab* (2015)

Hoff E., Greb C., Hollmann C., Hönig E., Jacob R. The large GTPase Mx1 is involved in apical transport in MDCK cells. *Traffic* (2014)

Hoff E., Greb C., Hollmann C., Jacob R. The large GTPase Mx1 is involved in apical transport in MDCK cells. *GRK 1216 / SFB 593 Joint International Symposium, Marburg* (2014)

Hoff E., Greb C., Hönig E., Ringer K., Jacob R. Mx1, a large GTPase involved in intracellular transport. *ASCB Meeting Philadelphia, USA* (2014)

Hoff E., Greb C., Hollmann C., Jacob R. The large GTPase Mx1 is involved in apical transport in MDCK cells. *ASCB Meeting New Orleans, USA* (2013)

## 5.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Bauer, Baumeister, Becker, Bölker, Brändle, Brandis-Heep, Bremer, Buckel, Buttgereit, Frank, Galland, Glorius, Grolig, Hassel, Heimbrodt, Heldmaier, Homberg, Huber, Imhof, Jacob, Kahmann, Kämper, Kost, Kuhl, Lingelbach, Maier, Maisner, Matthies, Mösch, Önel, Plachter, Przyborski, Rebscher, Renkawitz-Pohl, Schachtner, Steinberg, Wegener, Yu, Zauner, Ziegenhagen.



## 5.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**„Charakterisierung der großen GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) im intrazellulären Proteintransport“**

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in Hoff *et al.* in Traffic (2014).

Marburg, den 25.09.2015

---

(Florian Hoff)